

ゲノム編集のためのブタ前核期胚のガラス化保存法
および CRISPR/Cas9 システムの
導入条件に関する研究

The studies on improving embryo vitrification and
introduction conditions of CRISPR/Cas9 system into
embryos at the pronuclear stage for genome editing in pigs

2018 年 2 月

麻布大学大学院 獣医学研究科

動物応用科学専攻 博士後期課程

動物生殖科学

DA1503 鴨下 真紀

目次	・・・ 1
略語一覧	・・・ 5
論文要旨	・・・ 7
ABSTRACT	・・・15
総合序論	・・・17
第一章	
カルボキシル基導入ポリリジンを用いたブタ前核期胚のガラス化保存法の改良	・・・22
<序論>	
<材料および方法>	
・試薬	
・COCs の採取	
・IVM	
・精巢上体尾部精子の凍結保存	
・IVF および IVC	
・ブタ前核期胚のガラス化保存時における平衡液での平衡時間の検討	
・COOH-PLL を含むガラス化保存液への暴露がブタ前核期胚の発生能に及ぼす影響	
・ガラス化保存液に添加する COOH-PLL 濃度の検討	

- ・胚移植
- ・統計処理

<結果>

- ・ブタ前核期胚のガラス化保存時における平衡液での平衡時間の検討
- ・COOH-PLL を含むガラス化保存液への暴露がブタ前核期胚の発生能に及ぼす影響
- ・ガラス化保存液に添加する COOH-PLL 濃度の検討
- ・P20 によりガラス化保存したブタ前核期胚の産子への発育能

<考察>

第二章

ブタ前核期胚への CRISPR/Cas9 システム導入条件の検討 ……40

<序論>

<材料および方法>

- ・LIF を標的とした CRISPR/Cas9 gRNA の作製
- ・pCAG-EGxxFP による LIF gRNA の切断活性評価
- ・前核期胚に注入する gRNA および Cas9 mRNA の調整
- ・前核期胚の作出
- ・前核期胚への gRNA および Cas9 mRNA の顕微注入
- ・前核期胚への gRNA および Cas9 タンパク質の顕微注入
- ・胚盤胞のゲノムシーケンス
- ・統計処理

<結果>

- ・pCAG-EGxxFP による LIF gRNA の活性評価
- ・異なる濃度の LIF gRNA および Cas9 mRNA を注入したブタ前核期胚の生存性および体外発生能
- ・異なる濃度の LIF gRNA および Cas9 タンパク質を注入したブタ前核期胚の生存性および体外発生能
- ・異なる濃度の LIF gRNA および Cas9 mRNA を注入したブタ前核期胚由来胚盤胞のゲノム変異率
- ・異なる濃度の LIF gRNA および Cas9 タンパク質を注入したブタ前核期胚由来胚盤胞のゲノム変異率

<考察>

第三章

ガラス化保存ブタ前核期胚への gRNA および Cas9 注入後における発生能の検討

・・・52

<序論>

<材料および方法>

- ・試薬
- ・ガラス化保存ブタ前核期胚への LIF gRNA および Cas9 mRNA あるいはタンパク質の顕微注入
- ・LIF gRNA および Cas9 タンパク質注入胚の胚移植
- ・ブタ胚盤胞における LIF および LIF 受容体の免疫蛍光染色

・統計処理

<結果>

・異なる濃度の LIF gRNA および Cas9 mRNA を注入したガラス化保存ブタ前核期胚の生存性および体外発生能

・異なる濃度の LIF gRNA および Cas9 タンパク質を注入したガラス化保存ブタ前核期胚の生存性および体外発生能

・LIF gRNA および Cas9 タンパク質を注入したブタ前核期胚の胚移植

・ブタ胚盤胞における LIF および LIF 受容体の発現と局在

<考察>

総合考察62

結論65

参考文献66

謝辞80

図表81

略語一覧

BSA: bovine serum albumin

COCs: 卵丘細胞-卵子複合体(cumulus-oocyte complexes)

COOH-PLL: カルボキシル基導入ポリリジン(carboxylated ϵ -poly-L-lysine
)

CPA: 凍害保護物質(cryoprotectant)

CRISPR/Cas9: clustered regularly interspaced short palindromic repeats/
CRISPR associated proteins

dbcAMP: dibutyryl cyclicAMP

DMSO: dimethyl sulfoxide

eCG: equine chorionic gonadotropin

EG: ethylene glycol

ES: 胚性幹(embryonic stem)

FCS: ウシ胎児血清(*fet al* calf serum)

GFP: green fluorescent protein

GP130: glycoprotein 130

gRNA: guide RNA

hCG: human chorionic gonadotropin

HEK293cells: human embryonic kidney cells 293

iPS: 人工多能性幹(induced pluripotent stem)

IVC: 体外発生培養(*in vitro* culture)

IVF: 体外受精(*in vitro* fertilization)

IVM: 体外成熟培養(*in vitro* maturation)

IVP: 体外胚生産(*in vitro* production)

KI: knockin

KO: knockout

LIF: 白血病阻止因子(leukemia inhibitory factor)

M-199: Medium 199

NCSU-37: North Carolina State University-37

OPS: Open Pulled Straw Method

PAM: protospacer adjacent motif

PB1: Dulbecco's phosphate buffered saline

PFA: paraformaldehyde

pFF: porcine follicular fluid

PI: Propidium Iodide

Pig FM: pig fertilization medium

PVA: polyvinyl alcohol

SDS: sodium dodecyl sulfate

SSV: Solid Surface Vitrification

STAT: signal transducers and activator of transcription

TALEN: Transcription Activator-Like Effector Nuclease

ZFN: Zinc-Finger Nuclease

論文要旨

第一章

カルボキシル基導入ポリリジンを用いたブタ前核期胚のガラス化保存法の改良

【序論】

ブタは家畜として優れた繁殖能力や発育能力を有し、食料供給源として人類に大きく貢献している。また、その臓器のサイズおよび形態はヒトとの類似性が高く、ヒトへの臓器提供動物あるいは疾患モデル動物としても非常に有用である。人類は優秀な動物を選抜して繁殖させる方法で利用目的に適した家畜を作り出し、そこへ人工授精・胚移植等の技術を適用して、家畜の改良を効率的に行ってきた。しかし、この手法は改良に非常に多大な時間を要する。そこで人類が解決しなければならない食料増産等の解決法の1つとして、ゲノムレベルでの動物の機能や形質を改良する手法が有望視されている。そして、遺伝子組換えや特定遺伝子の機能を欠失させた KO 動物の作出が試みられ、多くの生物現象や疾病の解明等、様々な利活用が報告されてきた。これまでブタでは KO 動物を作出することは技術的に困難であった。その理由として、マウス・ラット以外の種では生殖系列に分化する ES 細胞株は確立しておらず、家畜では相同組換えした体細胞を核移植することでゲノムレベルで動物を改良していたことがあげられる。体細胞の相同組換え率が低率であるばかりでなく、核移植後の胚の発育能が著しく低いことが問題で、家畜における遺伝子改変動物作出の報告は少ない。しかし、最近、ZFN, TALEN や CRISPR/Cas9 システムといったゲノム編集技術が開発され、家畜においても遺伝子の KO/KI 動物作出が比較的簡便に行える可能性が示唆された。ゲノム編集技術を用いることにより、標的遺伝子を切断するように設計した人工ヌ

クレーゼを発現する DNA, mRNA あるいはタンパク質を受精卵や胚に注入するだけで, 目的の遺伝子を KO することが可能となった. 特に, CRISPR/Cas9 システムは生殖系列である前核期胚へ直接変異を簡便に高率に導入できる点がメリットであるが, ブタにおいては IVF による受精率が低いことから材料となる前核期胚を一度に多数作製することは難しいこと, CRISPR/Cas9 システムの最適な導入条件が明らかにされていないことなどにより, 効率的に KO 個体を作成することを困難にさせている. そこで, KO ブタの作出に際して, まず前核期胚を効率よく保存する方法を開発する必要があると考えた.

そこで, 第一章ではカルボキシル基導入ポリリジンを用いて胚の超低温保存方法の一つであるガラス化保存法を採用し, ブタ前核期胚の超低温保存法の改良を試みた.

【材料および方法】

食肉処理場由来のブタ卵巢より未成熟卵を採取し, 44 時間IVM し成熟卵を得た. 成熟卵を凍結融解ブタ精巣上体尾部精子と IVF させ, 10 時間後に遠心処理を行うことで細胞内脂肪滴を偏在化させ, 前核を観察した. 前核が 2-3 つ観察できた胚を前核期胚として実験に供した. 前核期胚は修正 PB1 に 20% (v/v) FCS を添加した洗浄液で 3 回洗浄し, PB1 に 20% (v/v) FCS, CPA として 15% (v/v) EG およびカルボキシル基導入ポリリジン(COOH-PLL) を加えた平衡液に室温で 10 分間平衡させた後, PB1 に 20% (v/v) FCS, CPA として 30% (v/v) EG, 0, 1, 10, 20 および 30% (w/v) COOH-PLL を含むガラス化液(P0, P1, P10, P20 および P30)で 1 分間静置し, Cryotop を用いてガラス化保存した. 平衡液中の COOH-PLL 濃度 (w/v) は, ガラス化液中の半量とした. ガラス化保存したブタ前核期胚は加温後に細胞膜が形態的に正常である胚を生存胚として, 生存率を調べた. また, 保存胚を体外発生培養

した後の2・4細胞期胚率および胚盤胞率を調べた。ガラス化保存を行わない胚を対照区とした。さらに、高い胚盤胞率を示したP20でガラス化保存したブタ前核期胚の産子への発生能を調べるため、加温後に前核期胚を発情同期化したレシピエント雌ブタへ外科的に移植した。

【結果】

P0, P1, P10, P20 および P30 でガラス化保存した胚の生存率は、それぞれ91.8%, 86.7%, 85.4%, 80.7%および76.8%で、試験区間に有意な差はなかった($P > 0.05$)。P0, P1, P10, P20 および P30 でガラス化保存した胚の2・4細胞期胚率はそれぞれ23.1%, 27.5%, 37.8%, 41.7%, 39.7%であり、P0およびP1において対照区(56.7%)と比較して2・4細胞期胚への発生率は低下した($P < 0.05$)。また、胚盤胞率はそれぞれ1.3%, 3.8%, 12.2%, 19.4%および4.8%であり、P20はP0よりも有意に高く($P < 0.05$)、対照区(28.4%)と有意差のない値を示した($P > 0.05$)。さらに、P20でガラス化保存した前核期胚918個を移植した8頭のレシピエント中2頭が分娩をし、計15頭の産子が得られた。

本研究では、様々な濃度でCOOH-PLLを含む保存液によりガラス化保存したブタ前核期胚の保存後の生存性に差は出なかったが、P20において胚盤胞への発生能が高く、対照区と有意差の無い値を示したことから、ブタ前核期胚のガラス化保存において、ガラス化液へ20% (w/v) COOH-PLLを含む保存液でガラス化保存することで保存後の胚盤胞への発生能を改善し、さらに、ガラス化保存後に産子への発育能を有するということが示された。本研究ではCOOH-PLLが保存過程においてどのように作用し、ガラス化保存後のブタ前核期胚の発生能を改善したのかという点については明らかになっていない。しかし、胚のガラス化保存液中のCOOH-PLLは従来CPAとして用いられてきたDMSOより毒性が低いことや浸透圧の急激な上昇を抑えること、さら

には氷晶形成を抑制する効果に優れていることなどが考えられる。今後、COOH-PLL の超低温保存の過程においてどのように細胞を保護するかについて、さらなる検討が必要である。

第二章

ブタ前核期胚への CRISPR/Cas9 システム導入条件の検討

【序論】

CRISPR/Cas9 システムにおいては、標的配列を認識する gRNA がヌクレアーゼである Cas9 を呼び込み、標的配列の DNA 二本鎖を切断する。CRISPR/Cas9 システムなどのゲノム編集技術では、受精卵である前核期胚に直接標的配列を認識するよう構築した人工ヌクレアーゼもしくはそれをコードする核酸を前核もしくは細胞質へ直接導入可能な点がメリットである。CRISPR/Cas9 システムでは、前核期胚へ導入する際、一般的に標的配列を認識する gRNA とヌクレアーゼである Cas9 を DNA, mRNA あるいはタンパク質の状態で顕微注入する。しかし、ブタでは受精卵へ直接 CRISPR/Cas9 システムを導入する手法ではなく、核移植後の個体への発生率が低いにもかかわらず、多くの報告において体細胞をゲノム編集してから、核移植を経て個体作出を行っている。この理由の 1 つとして、ブタでは CRISPR/Cas9 の前核期胚への導入条件の検討が不十分であることが考えられる。

本研究では、マウスにおいて着床に必須であるとされる LIF を標的とした gRNA の作製を行い、作製した gRNA および Cas9 mRNA あるいはタンパク質を前核期胚に注入し、その後の体外での発生能および胚盤胞のゲノム変異率を調べた。

【材料および方法】

gRNA は CRISPR direct ツールを使用して設計した。複数作製した gRNA のうち、最も切断効率が高い gRNA を選別するため、gRNA と Cas9 を共発現するプラスミドと pCAG-EGxxFP を HEK293cell にトランスフェクションし、最も切断効率の高い gRNA を選抜してから前核期胚の注入に用いた。gRNA および Cas9 発現プラスミドは *in vitro* 転写を行い、RNase free water で希釈した。第一章と同様の方法で作製したブタ前核期胚に、5 ng/ μ L gRNA + Cas9 mRNA (R5), 12.5 ng/ μ L gRNA + Cas9 mRNA (R12.5), 25 ng/ μ L gRNA + Cas9 mRNA (R25)あるいは 50 ng/ μ L gRNA + Cas9 mRNA (R50)を約 2 pL 顕微注入し、注入した胚の生存率および胚盤胞への発生率を調べた。対照群として、注入を行わなかった無処理胚および gRNA や Cas9 の希釈液を注入した Sham についても同様に生存率と発生率を調べた。さらに、10 ng/ μ L gRNA + Cas9 タンパク質(Pro10), 25 ng/ μ L gRNA + Cas9 タンパク質(Pro25)あるいは 50 ng/ μ L gRNA + Cas9 タンパク質(Pro50)を約 2 pL 顕微注入し、同様に生存率および胚盤胞率を調べた。得られた胚盤胞は回収し、PCR 産物のダイレクトシーケンスによりゲノム変異率を調べた。

【結果】

gRNA および Cas9 mRNA を注入したブタ前核期胚の生存率は無処理において 100%, Sham において 77.6%, R5 において 61.7%, R12.5 において 64.6%, R25 において 67.6%, R50 において 67.9%であり、Sham を含む顕微注入を行ったすべての試験区において胚の生存率は低下した($P < 0.05$)。胚盤胞率は無処理において 34.2%, Sham において 16.5%, R5 において 17.7%, R12.5 において 18.2%, R25 において 17.5%, R50 において 14.4%であり、試験区間に有意な差はみられなかった($P > 0.05$)。gRNA および Cas9 タンパク質を注入した前核期胚の生存率は Pro10 において 72.7%, Pro25 において 75.0%, Pro50 において 64.3%であり、無処理(100%)および Sham(76.0%)と

比較して有意に低い生存率を示した($P < 0.05$). 胚盤胞率は、無処理において 36.7%, Sham において 8%, Pro10 において 9.1%, Pro25 において 14.3%, Pro50 において 12.5%であり、試験区間に有意な差はみられなかった($P > 0.05$). gRNA および Cas9 mRNA を注入した前核期胚由来胚盤胞を回収し、ゲノムシーケンスを行った結果、R5 において 7.7%, R12.5 において 40.0%, R25 において 50.0%, R50 において 12.5%であり、R25 は R5 と比較して高いゲノム変異率を示した($P < 0.05$). また、Pro25 において、ゲノム変異率は 83.3%, Pro50 において 100%と高いゲノム変異率を示した.

これらの結果により、gRNA および Cas9 mRNA あるいはタンパク質のブタ前核期胚への注入は、胚の生存性を低下させるものの、胚盤胞への発生能には影響を及ぼさないことを示した. また、gRNA および Cas9 mRNA の注入試験結果より、R25 において最も高いゲノム変異率を示したため、効率よくブタのゲノム編集胚を作出するためには適切な濃度の gRNA および Cas9 mRNA を注入する必要があると考えられた.

第三章

ガラス化保存ブタ前核期胚への gRNA および Cas9 注入後における 発生能の検討

【序論】

家畜としてあるいは実験動物として重要なブタに対して効率的にゲノム編集などによる遺伝子改変を行うためには、個体へ発生しうるブタ生殖系列のどの細胞をゲノム操作する対象とするか、さらにその細胞をどのように効率的に供給するかが課題であることから、第一章でブタ前核期胚の超低温保存法を改良しうることを示した. しかしながら、超低温保存後の前核期胚に対するゲノム編集を施すための顕微注入などの操作がその後の発生に及ぼす影響

について検討する必要がある。そこで第一章により確立した 20% (w/v) COOH-PLL 添加液を用いてガラス化保存したブタ前核期胚に gRNA および Cas9 を注入し、その後の発生能を評価した。さらに、新鮮あるいはガラス化保存ブタ前核期胚へ 25 ng/ μ L gRNA + Cas9 タンパク質を注入し、胚移植を行い胎子の有無の確認を行った。

【材料および方法】

第一章と同様の方法で作出した前核期胚を 20% (w/v) COOH-PLL 添加液を用いてガラス化保存し、加温後に gRNA および Cas9 mRNA あるいはタンパク質を注入し、IVC 後の生存率および発生率を調べた。注入試験区は第二章と同様に設定した。さらに、Pro25 を注入した新鮮およびガラス化前核期胚を胚移植し、28 日後に子宮を採取し胎子の作出を試みた。

【結果】

gRNA および Cas9 mRNA を注入したガラス化保存前核期胚の生存率は無処理において 100%, Sham において 8.3%, R5 において 31.8%, R12.5 において 31.6%, R25 において 50%であり, Sham では生存率は低下した($P < 0.05$)。また,胚盤胞率は無処理において 9.1%, Sham において 0%, R5 において 13.6%, R12.5 において 0%, R25 において 9.1%であり, 試験区間に有意な差はみられなかった($P > 0.05$)。gRNA および Cas9 タンパク質を注入したガラス化保存前核期胚の生存率は無処理において 59.5%, Sham において 32.4%, Pro10 において 27.0%, Pro25 において 34.2%, Pro50 において 16.2%であり, Pro50 は無処理と比較して有意に低い生存率を示した($P < 0.01$)。胚盤胞率は無処理において 2.7%, Sham において%, Pro10 において 2.7%, Pro25 において 5.4%, Pro50 において 5.3%であった。Pro25 を注入した新鮮およびガラス化前核期胚を胚移植した結果, 胎子は確

認できず、また着床痕も観察されなかった。

以上の結果より、ガラス化保存したブタ前核期胚に gRNA および Cas9 を注入した結果、胚盤胞に発生することが示された。また、胚移植後に胎子への発育は確認されなかったが、LIF は胚の発生にも関与していると言われているため、ゲノム編集が生じ LIF が欠損し着床がみられなかった可能性もあり、ブタ胚発生における LIF の役割について、さらなる研究が必要であると考えられる。

ABSTRACT

Genome editing technologies including ZFNs, TALENs and CRISPR/Cas9 system are now available in various organisms even in domestic animals. It is also thought that CRISPR/Cas9 system would facilitate genome editing compared with by using ZFNs or TALENs. In addition, genome editing by using CRISPR/Cas9 system could directly apply to embryos at the pro-nuclear stage (PN embryos) by microinjection of DNAs, RNAs or proteins which induce targeted double-stranded breaks without through somatic cell nuclear transfer, or embryonic stem cells. However, in many reports on successful production of knock-out pigs, the nuclear transfer method is mainstream, because the optimal conditions of microinjection into porcine embryonic cells has not been clarified. Furthermore, it is difficult to obtain a lot of early embryos such as PN embryos, because rates of embryo production *in vitro* are still low and that the embryo cryopreservation is pretty difficult in the pig. Therefore, in the present study, the cryopreservation of PN embryos in pigs was first tried to improve. The *in vitro* and *in vivo* development of the PN embryos cryopreserved using the solution supplemented with EG and COOH-PLL were evaluated. The *in vitro* developmental rate of cryopreserved embryos was improved by the vitrification solution supplemented with 20% (w/v) COOH-PLL, and to confirm *in vivo* development of cryopreserved embryos, the embryo transfer was performed. The offspring derived from the vitified/warmed embryos was obtained.

Secondly, the effects of various concentrations of gRNA and mRNA or protein of Cas9 which targeted the gene of porcine LIF on rates of *in vitro*

development to blastocysts and induction rates of the gene mutation in fresh and cryopreserved PN embryos were evaluated. The results showed that there were no significant ($P > 0.05$) differences in the blastocyst rates of the fresh and cryopreserved PN embryos microinjected to different concentrations of gRNA and Cas9 mRNA or protein. However, the rates of gene mutation of the fresh PN embryos microinjected to 25 ng/ μ L gRNA + Cas9 mRNA (50.0%) was significantly higher ($P < 0.05$) than that of fresh PN embryos microinjected to 5 ng/ μ L gRNA + Cas9 mRNA (7.7%). Microinjection of 25 and 50 ng/ μ L gRNA + Cas9 protein into fresh PN embryos resulted in 83.3% (25 ng/ μ L) and 100% (50 ng/ μ L) of the rates of gene mutation. However, the fresh and cryopreserved embryos which microinjected to 25 ng/ μ L gRNA + Cas9 protein and transferred, did not develop to fetus in the uteri of recipients. Therefore, whether the LIF is concerned with the blastocysts development was investigated. In the results, LIF and LIF receptor were expressed in porcine blastocysts, therefore it suggested that LIF may work in blastocysts. Further research is required to clarify the role of LIF in porcine embryo development. In conclusion, cryopreservation method for porcine PN embryos was successfully improved and the results showed the rates of gene mutation were affected by the concentration of gRNA + Cas9 mRNA. Furthermore, it is confirmed that cryopreserved PN porcine embryos could develop into blastocysts after the microinjection of gRNA + Cas9 mRNA or protein. The findings of the present study would contribute to the efficient production of the genetic modification pigs.

総合序論

ブタは家畜として優れた繁殖能力や発育能力を有し、人類に食料としての重要なタンパク質・脂肪を提供している。また、その体や臓器のサイズおよび形態がヒトとの類似性が高く、ヒトへの臓器提供動物あるいはヒト疾患モデル動物としても非常に有用である(Nagashima & Matsunari, 2016)。これからの人類の課題として、持続可能な社会の構築のための食料増産や先端医療などの分野での多くの解決すべき課題が山積している。ブタを改変して利活用することで、その一部を解決する可能性がある。人類はこれまで人類の福祉や健康な生活に役立てるために、目的に適した家畜を作り出してきた。その基本的な手法は、動物を評価して選抜し、そしてその子孫をさらに評価して、選抜して繁殖させる方法である(Bhat *et al.*, 2017)。さらには、そこへ人工授精や胚移植などの生殖補助技術を適用して、動物の改良を効率的に行ってきた。しかし、この手法は時間的制約が大きく、必ずしも目的の形質を持つ動物の作製ができるとは限らない。そこで、革新的な別の手法として動物の機能や形質を改良するためにゲノムレベルでの人為的操作による改変が有望視されている。これまでに異種生物の遺伝子断片を導入したり、入れ換えたりする「遺伝子組換え」や特定遺伝子機能を欠損させる「遺伝子 KO」の動物作出が試みられ、多くの生物現象の解明、疾病の解明、家畜の生産性の改良、アニマルバイオリクターなど、様々な利活用が行われてきた。このようなゲノムレベルでの動物の改良は、研究の初期段階においては初期胚を含む未分化な生殖系列の細胞に対する遺伝子断片の顕微注入操作や遺伝子断片の相同組換えによって行われていた(Schwartzberg *et al.*, 1989)が、決して効率の良いものでなく、対象ゲノムのホモ化にはファウンダー個体からさらに交配を重ねる必要があった。また、これまでマウスやラット以外の動物種では生殖系列の細胞に分化する ES 細胞株は確立しておらず(Dobrinski, 2005)、

そのため家畜では相同組換えした体細胞を体細胞核移植することで KO 動物を作出していた(McCreath *et al.*, 2000). この方法では体細胞の相同組換え率が非常に低率であるばかりでなく, 核移植後の胚発生能や産子への発育能が著しく低下してしまうことが問題であり, ブタをはじめとする家畜では KO 動物の研究はあまり盛んには行われなかった(Watanabe *et al.*, 2013). しかし, 近年ゲノム編集技術が開発され, 家畜においても特定遺伝子の KO/KI が比較的簡便に行えるようになった. ゲノム編集は現在までに三種類報告されている. 第一世代のゲノム編集技術である, ZFN (Kim *et al.*, 1996)は, 標的配列を認識する DNA 結合ドメインと制限酵素 FokI を配列非依存的な DNA 切断ドメインを融合した人工ヌクレアーゼである. 人工ヌクレアーゼは 5'-3'方向とその相補鎖に対して作製し, 2 つを 1 セットとして使用する. DNA 結合ドメインが標的配列に結合すると, FokI の DNA 切断ドメインが二量体を形成し, 標的配列の間の配列であるスペーサー配列に二本鎖切断を誘導する. ZFN は Cys2His2 型のジンクフィンガーを DNA 結合ドメインとして応用したもので, 1 つのジンクフィンガーが 3 つの塩基を認識するため, 3-6 個のジンクフィンガーを連結したジンクフィンガーアレイを標的配列に結合させることで DNA の認識を行うことが可能である(Kim *et al.*, 1996). しかし, ZFN は前述のように 1 つのジンクフィンガーが 3 塩基を認識するため, 目的の配列を認識するジンクフィンガーの選別や作製が難しいことが問題となっていた. 2010 年になると, 第二世代のゲノム編集技術である, TALEN (Boch *et al.*, 2010)が報告された. TALEN は, 植物病原細菌であるキサントモナス属がもつ TALE というタンパク質を DNA 結合ドメインに応用した技術である. TALE は約 34 アミノ酸を基本単位としたモジュールの繰り返し構造からなり, 1 つのモジュールが 1 塩基を認識する. そのため, 理論的にはゲノム上のどの配列でもモジュールをつなぎ合わせるだけで認識することが可能で, 標的配列選別の自由度は ZFN よりも高い(Boch *et al.*, 2010). そのため, TALEN は遺伝子改変動物作製の主流に

なることが期待された。しかし、2012 年になると、第三世代のゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 システムが報告され(Jinek *et al.*, 2012), より簡便に遺伝子改変動物の作製が可能となった。CRISPR/Cas9 は、真正細菌や古細菌がもつ外来の核酸を排除する獲得免疫機構 CRISPR/Cas システムを応用した技術である。この免疫機構は、はじめに自身のゲノム中に存在するリピート配列とスペーサー配列が直列に並んだ領域(CRISPR 領域)のスペーサー部分に外来 DNA 配列の一部を取り込むことで免疫源を獲得する。次に、取り込んだ DNA 配列から RNA を合成し、リピート部分を削除することで、標的 DNA と相同な配列をもつ短鎖 RNA を量産する。この短鎖 RNA が外来 DNA に取りついた領域に呼び込まれたヌクレアーゼによって、標的配列は切断される(Wiedenheft *et al.*, 2012)。ゲノム編集に応用する場合は、ヌクレアーゼである Cas9 と、Cas9 を呼び込む人工的に合成した短鎖 RNA (gRNA)を細胞に共発現させるだけで、標的配列を切断することが可能である。

こうしたゲノム編集技術の特徴は、標的遺伝子を切断するように設計した人工ヌクレアーゼを発現する DNA, mRNA あるいはタンパク質を受精卵や胚に注入するだけで、目的の遺伝子を KO することが可能となる点にある。また、この方法を応用して遺伝子の KI も可能である(Bibikova *et al.*, 2003)。すでに、ブタ(Lillico *et al.*, 2013)、ウシ(Yu *et al.*, 2011)などの家畜でゲノム編集技術による遺伝子 KO/KI 動物の作出が報告されていることから、今後ブタにおいても遺伝子 KO/KI の研究はますます発展していくと考えられる。ゲノム編集技術では、前述のように直接人工ヌクレアーゼを注入した受精卵をレシピエントに胚移植するだけで簡便に KO 動物を作製することができることが利点である。しかし、ブタにおいては先行研究(Li *et al.*, 2015; Butler *et al.*, 2016; Bi *et al.*, 2016; Niu *et al.*, 2017)の多くがゲノム編集した体細胞を核移植し、産子を作成している。この理由として、ブタでは前核期胚に顕微注入する際の核酸の濃度や核酸の形態についての至適条件は明らかにされていないこ

とが、ひとつの要因であると考えられる。加えて、ゲノム編集技術による KO 動物の作製には、移植可能な受精直後の胚(前核期胚)を多数準備しなければならない。また、ブタでは胚による母体の妊娠認識に複数の胚によるシグナルが必要だと考えられている(Polge *et al.*, 1966)。さらに、マウスなどの実験動物では体内で生産された胚を用いることが一般的であるが、ブタでは多くの費用や手間を要するため体外で生産した胚を用いることが効率的であると考えられる。これらのことから、ゲノム編集技術による KO ブタの作製には、まず個体へ発生する能力のあるゲノム編集の対象となる生殖系列の対象を決定する必要がある。その対象は、一般的には「受精卵」であるが、効率的に「受精卵」を入手するには体外由来の「受精卵」である前核期胚を効率よく保存する方法を開発する必要があると考えられた。さらにその胚の保存は、一般的に液体窒素中で細胞を半永久的に保存可能な超低温保存技術が用いられる。しかし、ブタ胚は低温感受性が高いため、超低温保存が難しいと考えられている(Somfai *et al.*, 2009)。哺乳類における胚の超低温保存は緩慢凍結法とガラス化保存法に大別されるが、一般に保存後の生存性および発生能が高いとされるガラス化保存(Rienzi *et al.*, 2017)を用いても、保存したブタ胚の発生能は低いことが知られている(Somfai *et al.*, 2012)。ガラス化保存後の胚の生存性や発生能は様々な要因によって決定するが、特に保存液中の CPA の選択が重要である(Martínez *et al.*, 1998)。

本研究は、ブタにおけるゲノム編集技術の効率化を目的に材料となるブタ前核期胚供給の改良およびブタ前核期胚への CRISPR/Cas9 システムの導入条件を調べた。第一章では、ブタにおいてゲノム編集による改変を効率的に行うこと、すなわちゲノム編集を施す材料としての生殖系列の対象細胞として「受精卵」である前核期胚を超低温保存しゲノム編集の対象細胞を効率的に供給することを最終目的に、体外で生産したブタ前核期胚のガラス化保存の保存液への新規 CPA の添加について検討した。第二章ではブタにおける

CRISPR/Cas9 システムの効率化を目的とし、LIF を標的として、ブタ前核期胚への CRISPR/Cas9 システムの導入条件が、その導入胚の体外での生存性、発生能および胚盤胞でのゲノム変異率に及ぼす影響を検討した。第三章では、第一章で改良したガラス化保存法により保存したブタ前核期胚へ CRISPR/Cas9 システムを導入後の胚盤胞への発生能を調べ、さらに胚移植により胎子への発育能も調べた。

第一章

カルボキシル基導入ポリリジンを用いたブタ前核期胚の ガラス化保存法の改良

序論

ゲノム編集技術の急速な発展により、マウス・ラットをはじめとする実験動物だけでなく、家畜においても遺伝子改変動物の開発や研究は進展している。ブタは家畜としての利活用のほか、生理学および解剖学的にヒトに近いことから、疾病モデルとしてあるいは不足しているヒトへの臓器移植のドナーとしての適用も期待されており、様々な遺伝子改変ブタの開発が急速に進んでいる (Ryu *et al.*, 2018). ゲノム編集技術のひとつである CRISPR/Cas9 システムを用いて KO/KI 動物を作出する際には、標的配列を認識する gRNA と、ヌクレアーゼである Cas9 を DNA, mRNA あるいはタンパク質のいずれかの状態で前核期胚に顕微注入する手法が広く用いられている (Mashimo *et al.*, 2013). ブタでは体内由来の前核期胚を採取するために、過剰排卵を誘起した雌ブタに人工授精を施し、外科的に前核期胚を採取する必要がある (Hisamatsu *et al.*, 2015). しかし、この手法は適切な設備が必要であり、習熟技術も要するため、IVP により作出した前核期胚を実験に用いることが多い (Lillico *et al.*, 2013). しかし、IVP により作出したブタ前核期胚をレシピエント雌ブタに移植した際の産子率は 10-20% と低いことから、一頭のレシピエント雌ブタに 100 個程度の前核期胚を移植する必要がある (Somfai *et al.*, 2012), KO/KI ブタを作出するためには、一度に多量の前核期胚を準備する必要があるが、その工程は非常に複雑である。そこで、あらかじめ前核期胚を保存しておくことで、KO/KI 作出の効率化が可能となると考えられる。生殖細胞を保存する方法の一つである超低温保存は、生殖細胞を -196°C の液体窒素中で保存する技術であり、有用な遺伝資源を効率的かつ半永久的に保存することを可能とし、動物の飼育に要する経費や面積の削減、ヒト生殖補助医療への応用、生殖細胞の長距離もしくは国際間の輸送、疾病や遺伝的な汚染の防止、過剰に採取あるいは作製した未受精卵および胚の保存、胚移植における胚のドナ

一とレシピエントの発情同期化を不要にするなどの点でも非常に有用である。哺乳類の卵や胚の超低温保存は 1972 年に Whittingham らにより、はじめて緩慢凍結法によって凍結融解したマウス胚から産子を作成することに成功した(Whittingham *et al.*, 1972). この成功の要因として, CPA に DMSO を用いたこと, 凝固点よりやや高い温度で植氷処理を行い, 潜熱の発生を防止して障害となる胚細胞内氷晶形成を防いだこと, 緩慢な冷却速度で凍結したことがあげられる. その後, ウシ胚(Wilmut & Rowson, 1973)やヒツジ胚(Willadsen *et al.*, 1976)など様々な動物種で胚の緩慢凍結保存の成功例が報告されるとともに, 冷却速度や液体窒素への投入温度などが検討され, 胚の凍結技術は改良されていった. しかし, 緩慢凍結法では氷点下の低温域に一定時間胚を暴露するため, 低温感受性の高い動物種やステージの胚や卵への応用は困難であった(Somfai *et al.*, 2012; Arav, 2014).

その後, 1985 年に Rall と Fahy はガラス化保存法によりマウス 8 細胞期胚を超低温保存することに成功した(Rall & Fahy, 1985). ガラス化保存法とは, 50%前後の高濃度の CPA を含むガラス化保存液へ胚を短時間(1 分間前後)感作させ, 直後に液体窒素蒸気あるいは液体窒素中に直接投入する方法であり, 急速に冷却することで氷晶形成を伴わないままサンプルをガラス化することが可能である. この方法により, 今まで不可能であった動物種あるいはステージの胚や未受精卵の超低温保存が可能になり, 実験動物ではマウス(Quinn & Kerin, 1986), ラット(Kono *et al.*, 1988), ウサギ(Smorag *et al.*, 1989)など, 家畜ではヒツジ(Schiewe *et al.*, 1991), ウシ(Saha *et al.*, 1994), ブタ(Yoshino *et al.*, 1993)などで成功が報告された. さらに 1996 年には, Martino らが電子顕微鏡の EM グリッドを用いた最小容量のガラス化保存液により超急速に冷却および加温を行う超急速冷却ガラス化保存法を開発した(Martino *et al.*, 1996). この方法は, ガラス化保存液の容量を少なくすることで冷却速度を速め, ガラス化転移を促進することで従来のガラス化液より

CPA 濃度を低下させることに成功し、保存後に高い生存性を維持することを可能とした。その後も超急速冷却ガラス化法として、Lane & Gardner が開発した Cryo-Loop 法(Lane *et al.*, 1999), Vajta らが開発した Open Pulled Straw Method (OPS 法)(Vajta *et al.*, 1998), Kuwayama が開発した Cryotop 法(Kuwayama, 2007)などの様々な手法が現在までに報告されている。しかし、ブタの卵や胚は細胞のサイズがマウス等の胚と比較して大きいこと(Vajta, 2000)や、細胞内に脂肪滴が存在すること(Nagashima *et al.*, 1994)などから、低温感受性が高く、超低温保存が非常に難しいことが知られている。それでも超低温保存したブタの胚より産子を作成した成功例(Hayashi *et al.*, 1989; Kashiwazaki *et al.*, 1991)は報告されていたが、長嶋らによって、細胞内の脂肪滴を除去して超低温保存したブタ胚は低温に対して抵抗性が向上するということが明らかにされ、超低温保存したブタ胚の胚発生能は飛躍的に向上した(Nagashima *et al.*, 1994; Nagashima *et al.*, 1995)。しかし、ブタでは食肉処理場由来の卵巣から採取した未成熟卵を IVM し、得られた成熟卵を IVF することにより作成した胚、すなわち IVP した胚の発生能は低下してしまうことが知られている。これは、IVF の際に多精子受精が頻発することや、IVC 中の酸化ストレスに起因する(Nagai *et al.*, 2006)。そのため、IVP 由来胚の超低温保存は体内由来の胚よりも難しく、超低温保存した IVP 由来胚からはじめて産子を作成した報告がされたのは最近のことである(Nagashima *et al.*, 2007)。その中でもブタ前核期胚の超低温保存はとりわけ難しい胚の発育ステージであることが知られており、2009 年に Somfai らが Solid Surface Vitrification (SSV)によりガラス化保存したブタ前核期胚から初めて産子を作成(Somfai *et al.*, 2009)することに成功して以来、超低温保存したブタ前核期胚から産子を作成した報告はされていない。また、Somfai らの方法(Somfai *et al.*, 2009)では新鮮な前核期胚と比較すると発生能は低く、さらなる改善の余地があると考えられている。

卵や胚のガラス化保存の改良をするために、ガラス化保存液に含まれる CPA の検討は重要である。ガラス化保存液中に含まれる CPA には、大きく分けて細胞膜浸透性と細胞膜非浸透性の 2 種類があり、卵や胚の超低温保存の場合、この両者を組み合わせて使用する。細胞膜浸透性の CPA は細胞質内の水と置き換わることで氷晶形成を抑制する作用があり、細胞膜非浸透性の CPA はガラス化保存液の浸透圧を調整し、細胞質内を適切に脱水し細胞膜を保護する作用がある。前者には DMSO, EG, glycerol, 1,2-propanediol 等があり、後者には sucrose, trehalose, ficoll, raffinose 等がある。近年、細胞膜非浸透性の新規 CPA として COOH-PLL が開発された(Matsumura & Hyon, 2009)。COOH-PLL は分子量約 5,000 の高分子化合物であり、従来 CPA として主に用いられてきた DMSO よりも細胞毒性が低く、ヒト iPS 細胞やマウス線維芽様細胞などにおいて超低温保存後の生存性を改善することが報告された(Matsumura & Hyon, 2009)。さらに、マウスの未受精卵や前核期胚の超低温保存においても COOH-PLL が有効であることが報告されている(Watanabe *et al.*, 2013; Shibao *et al.*, 2014)。これらのことから、COOH-PLL は今まで困難であった動物種あるいはステージにおける卵や胚の超低温保存やヒト生殖補助医療への応用などが期待されている。

本研究ではブタ前核期胚のガラス化保存において、さらなる生存性および胚発生能の向上を目的とし、SSV 法よりガラス化保存後の生存性および胚発生能が高いとされている Cryotop (Somfai *et al.*, 2012)を用いた最小容量ガラス化法で、ガラス化保存液への COOH-PLL の添加がガラス化保存したブタ前核期胚の生存性およびその後の体外での発生能に及ぼす影響を検討した。

材料および方法

本実験は麻布大学動物実験委員会 (ID#140219-4) の承認を得て行った.

<試薬>

使用した試薬は特別な記載がない限り, 全て Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA) から購入した.

<COCs の採取>

食肉処理場において, 未経産ブタから卵巣を採取し, 0.2% 硫酸カナマイシン (Meiji Seika Pharma. Tokyo, Japan) を含む 38.5°C の生理食塩水で洗浄後, 魔法瓶に入れて保温し研究室に運搬した. 18 G の注射針 (18 G x 1 1/2 S.B.; TOP. Tokyo, Japan) を装着した 5 mL ディスポーザブルシリンジ (TOP. Tokyo, Japan) を用いて, 卵巣表面の直径 2-6 mm の卵胞より, 卵胞液とともに COCs を吸引し, 15 mL ポリプロピレンコニカルチューブ (Becton, Dickinson and Company: BD. Tokyo, Japan) に集めた. 採取した卵胞液は, 90 mm プラスチックシャーレ (Kanto Chemical. Tokyo, Japan) に移し, 実体顕微鏡下で卵丘細胞が三層以上付着した COCs のみを選別し, 5% (v/v) の FCS (Gibco/Invitrogen. Carlsbad, CA), 20 mM HEPES, antibiotics (100 U/mL penicillin G potassium および 0.1 mg/mL streptomycin sulfate) を添加した M-199 に回収した.

<IVM>

回収した COCs を IVM 培地で 3 回洗浄し, 4-well dishes (Nunclon Multidishes; Nalge Nunc International. Roskilde, Denmark) の各スポットに入れた 500 μ L の IVM 培地へ 40-50 個の COCs を移し, 22 時間培養した.

IVM 培地は 10% (v/v) pFF, 0.6 mM cysteine, 20 μ M beta-mercaptoethanol, 1 mM (dbcAMP), 10 U/mL eCG (PMS 1000 U: Nihon Zenyaku Kogyo. Fukushima, Japan), 10 U/mL hCG (Puberogen 500 U: Novartis Animal Health. Tokyo, Japan)を添加した修正 NCSU-37 (Suzuki *et al.*, 2000)を用いた。その後, COCs は dbcAMP, eCG および hCG を除いた IVM 培地で 22 時間培養した。培養は, 炭酸ガスインキュベーター中にて, 38.5°C, 5% CO₂, 95% air, 湿度飽和の条件下で行った。

<精巣上体尾部精子の凍結保存>

精巣上体精子は既報(Kikuchi *et al.*, 1998)に従い凍結処理を行った。食肉処理場由来のブタ精巣上体を室温で研究室まで輸送した。精巣上体尾部を精巣より分離し, シリンジで輸精管内に空気を送り込むことで精巣上体精子を採取した。採取した精子を 30 mL の前処理液で希釈し, 精子懸濁液を 15°C で 3 時間冷却し, 1,200 x g で 10 分間遠心処理を行った。上清を除去し, 沈殿部精子を 15 °C に冷却した 310 mM lactose (Kanto Chemical. Tokyo, Japan), 1,000 U/mL penicillinG potassium, 1 mg/mL streptomycin sulfate, 20% (v/v) egg yolk を含む NSF-I 希釈液で再懸濁させ, 約 2 時間かけて 4°C まで冷却した。さらに NSF-I 希釈液に 1.48% (v/v) equex stem (Noba Chemical Sales. Scituate, MA), 6% (v/v) Glycerol (Wako Pure Chemical Industries. Osaka, Japan)を添加した NSF-II を等量加え, 懸濁した。最終精子濃度は 2.0×10^8 cell/mL となるように調整した。精子懸濁液を 0.25 mL ストローに封入し, 液体窒素蒸気中で 10 分間予備凍結を行った後, 液体窒素中に投入し保存した。

< IVF および IVC >

IVF は既報(Kikuchi *et al.*, 2002)に従い行った。すなわち, 35 mm プラスチ

ックシャーレ(BD. Tokyo, Japan)にパラフィンオイル(Liquid Paraffin: Kanto Chemical. Tokyo, Japan)で覆った IVF 培地 80 μ L のスポットを作製した. IVM 終了後に IVF 培地で COCs を 3 回洗浄し, IVF 培地の各スポットに 20 個程度ずつ COCs を入れた. 融解した凍結精巣上体精子を IVF 培地中で 15 分間前培養を行い, 精子の最終濃度が 1.0×10^6 cell/mL になるように調整し, 10 μ L の精子懸濁液を COCs の入ったスポットへ入れた. IVF 培地には Pig FM (Suzuki *et al.*, 2000)を使用した. IVF 終了 3 時間後にガラスピペットを用いて卵丘細胞を取り除き, IVC 培地で 3 回洗浄し, IVC を行った. IVF10 時間後, M-199 に前核期胚を回収し, $16,800 \times g$ で 10 分間遠心処理を行い, 細胞内脂肪滴を偏在化させ顕微鏡下で前核の有無を確認した(図 1). 前核が 2 もしくは 3 個確認できた胚(Somfai *et al.*, 2009)を一部ガラス化に用いた. ブタにおいて IVM により得られた成熟卵を IVF した場合は多精子受精が多いことが知られているが, 多精子受精した胚から産子を作出した報告(Han *et al.*, 1999)があり, ブタ前核期胚のガラス化保存を行った Somfai らも 3 前核期胚をガラス化保存に用いていることから(Somfai *et al.*, 2009), 3 前核期胚も前核期胚として実験に用いた. ガラス化に使用しなかった前核期胚は IVC を継続し, IVF 48 時間後に 2 細胞期胚, 168 時間後に胚盤胞を観察した. IVC 培地には, IVF を行った日を 0 日目として, IVC 0-2 日目には 4 mg/mL BSA, 50 μ M beta-mercaptoethanol, 0.17 mM sodium pyruvate, 2.73 mM sodium lactate を添加した NCSU-37 (IVC-PyrLac)を用い, IVC 2-6 日目には 5.55 mM glucose, 4 mg/mL BSA, 50 μ M beta-mercaptoethanol を添加した NCSU-37 (IVC-Glu)を使用した. 培養は 35 mm プラスチックシャーレにパラフィンオイルで覆った IVC 培地 50 μ L のスポット中で, 炭酸ガスインキュベーター中にて 38.5°C , 5% CO_2 , 95% air, 湿度飽和の条件下で行った.

<ブタ前核期胚のガラス化保存時における平衡液での平衡時間の検討>

ガラス化保存および加温は既報(Fujiwara *et al.*, 2010)を参考に行った. すなわち遠心処理したブタ前核期胚を, 37.5 °C で修正 PB1 (Whittingham, 1971)に 20% (v/v) FCS を添加した洗浄液で 3 回洗浄し, PB1 に 20% (v/v) FCS, CPA として 15% (v/v) EG を加えた平衡液あるいは 15% (v/v) EG および 5% (w/v) COOH-PLL (Watanabe *et al.*, 2013; Shibao *et al.*, 2014)を加えた平衡液に室温で 5 分間, 10 分間, 15 分間それぞれ平衡させた後, PB1 に 20% (v/v) FCS, CPA として 30% (v/v) EG を加えたガラス化液あるいは PB1 に 20% (v/v) FCS, CPA として 30% (v/v) EG および 10% (w/v) COOH-PLL を加えたガラス化液に室温で 1 分間平衡し, Cryotop (KITAZATO BioPharma. Shizuoka, Japan)を用いて液体窒素中に保存した. 液体窒素中で保存したブタ前核期胚は, 37.5 °C でPB1 に 20% (v/v) FCS, 1.0 M sucrose を添加した加温液に 1 分間平衡させ, PB1 に 20% (v/v) FCS, 0.5 M sucrose を添加した希釈液に 3 分間, PB1 に 20% (v/v) FCS を添加した洗浄液に 5 分間平衡させることで加温を行った. 加温を行ったブタ前核期胚は IVC-PyrLac で 3 回洗浄後, IVC-PyrLac にて 1 時間回復培養を行った. 回復培養後, 顕微鏡下でブタ前核期胚を観察し, 細胞膜の形態が正常であるものを生存胚とし, 生存判定を行った(図 2). その後, IVC-PyrLac にて 2 日間 IVC を用い, 続いて IVC-Glu にて 4 日間 IVC を行い, 38 時間後に 2・4 細胞期胚, 134 時間後に胚盤胞を観察した. 培養は 35 mm プラスチックシャーレにパラフィンオイルで覆った IVC 培地 50 μ L のスポット中で, 炭酸ガスインキュベーター中にて 38.5°C, 5% CO₂, 95% air, 湿度飽和の条件下で行った.

<COOH-PLL を含むガラス化保存液への暴露がブタ前核期胚の発生能に及ぼす影響>

ガラス化保存の手順と同様に前核期胚を洗浄液で洗浄し, 平衡液へ 10

分間平衡させた。その後、PB1 に 20% (v/v) FCS, 30% (v/v) EG を加えたガラス化液を基本として、COOH-PLL を 0% (w/v) (以下, P0), 1% (w/v) (以下, P1), 10% (w/v) (以下, P10), 20% (w/v) (以下, P20) および 30% (w/v) (以下, P30) それぞれ加えたガラス化液(表 1)へブタ前核期胚を暴露し、加温と同様の処理を行い、同様発生率を調べた。平衡液の CPA 濃度はガラス化液の半量とした。

<ガラス化保存液に添加する COOH-PLL 濃度の検討>

表 1 に示したガラス化液を用いてブタ前核期胚をガラス化保存し、IVC を行った。平衡液での平衡時間は 10 分間とし、平衡液の CPA 濃度はガラス化液の半量とした。ガラス化保存したブタ前核期胚の生存率および胚発生率を調べた。さらに、得られた胚盤胞を回収し、既報(Kikuchi *et al.*, 2002)に従いアセトオルセイン染色により胚盤胞数を調べた(表 2)。

<胚移植>

胚移植の方法は既報(Hisamatsu *et al.*, 2015)に従い行った。140 日齢以上のレシピエント雌ブタに、1500 U eCG を筋肉内注射し、72 時間後に 500 U hCG を筋肉内注射することで、発情の同期化を行った。hCG 投与約 48 時間後にレシピエント雌ブタに鎮静剤としてメシル酸マホプラジン(マフロパン 1% 注射液: DS Pharma Animal Health. Osaka, Japan)を 5 mL を筋肉内注射し、30 分後に導入麻酔としてチアミラールナトリウム(イソゾール注射用 0.5 g: Nichi-Iko Pharmaceutical. Toyama, Japan)を耳静脈投与後直ちにイソフルラン(エスカイン吸入麻酔薬: Mylan. Osaka, Japan)を吸入させた。P20 でガラス化保存および加温したブタ前核期胚は、5 mL ポリプロピレンラウンドチューブに入れた 20 mM HEPES を添加した IVC-PyrLac 中へ移し、38.5°C に調整した魔法瓶に入れて保温し豚舎に運搬した。ブタ前核期胚は外科的にレシ

ピエント雌ブタの卵管へ移植した。前核期胚を移植したレシピエント雌ブタは約 114 日後に分娩し、産子を確認した。

<統計処理>

すべての試験は、5 回以上繰り返し行った。また、データとして得られた%データは、アークサインにより角変換し、統計処理に用いた。統計は、Kruskal-Wallis test を行い、有意差が認められたデータは次いで Scheffe's method により、各群の比較を行った。

結果

＜ブタ前核期胚のガラス化保存時における平衡液での平衡時間の検討＞

P0によりガラス化保存を行った場合の各平衡時間における生存率(図3)は、平衡時間5分間において73.0%、平衡時間10分間において91.8%、平衡時間15分間において73.2%であり、平衡時間10分間において平衡時間5分間と比較し、有意に高い生存率を示した($P < 0.01$)。また、ガラス化を行わずにIVCを行った場合(以下、Fresh)およびP0の各平衡時間における胚発生率(図4)は、2・4細胞期胚への発生率がFreshにおいて56.8%、平衡時間5分間において13.0%、平衡時間10分間において23.1%、平衡時間15分間において8.3%であり、各平衡時間における2・4細胞期胚への発生率はFreshと比較して有意に低下した($P < 0.01$)。胚盤胞への発生率は、Freshにおいて28.4%、平衡時間5分間において0%、平衡時間10分間において1.3%、平衡時間15分間において1.7%であり、各平衡時間における胚盤胞への発生率はFreshと比較して有意に低下した($P < 0.01$)。

P10によりガラス化保存を行った場合の各平衡時間における生存率(図5)は、平衡時間5分間において84.0%、平衡時間10分間において83.0%、平衡時間15分間において87.6%であり、各平衡時間における生存率に有意な差は認められなかった。また、P10の各平衡時間における胚発生率(図6)は、2・4細胞期胚への発生率が平衡時間5分間において17.7%、平衡時間10分間において41.2%、平衡時間15分間において25.7%であり、平衡時間5分間および15分間において2・4細胞期胚への発生率はFreshと比較して有意に低下した($P < 0.05$)。一方、胚盤胞への発生率は平衡時間5分間において0%、平衡時間10分間において14.7%、平衡時間15分間において7.7%であり、平衡時間10分間では平衡時間5分間と比較して有意に高い胚盤胞への発生率を示した($P < 0.05$)が、平衡時間に関わらずガラス化保存を

行った場合、発生率は Fresh と比較して有意に低下した($P < 0.05$).

<COOH-PLL を含むガラス化保存液への暴露がブタ前核期胚の発生能に及ぼす影響>

COOH-PLL を含むガラス化保存液へ暴露したブタ前核期胚はすべて生存していた. COOH-PLL を含むガラス化保存液へ暴露したブタ前核期胚の 2・4 細胞期胚への発生率は P0 において 59.6%, P1 において 52.7%, P10 において 56.4%, P20 において 67.8%, P30 において 60.0% であり, 各試験区間に有意差はなく, ガラス化保存液に暴露していない Fresh (56.8%) とも有意な差は認められなかった($P > 0.05$) (図 7). COOH-PLL を含むガラス化保存液へ暴露したブタ前核期胚の胚盤胞への発生率は, P0 において 24.6%, P1 において 20.0%, P10 において 36.4%, P20 において 37.3%, P30 において 41.8% であり, 各試験区間に有意差はなく, ガラス化保存液に暴露していない Fresh (28.4%) とも有意差は認められなかった($P > 0.05$) (図 7).

<ガラス化保存液に添加する COOH-PLL 濃度の検討>

異なる濃度の COOH-PLL を添加した保存液でガラス化保存したブタ前核期胚の生存率(図 8)は, P0 において 91.8%, P1 において 86.7%, P10 において 85.4%, P20 において 80.7%, P30 において 76.8% であり, ガラス化保存液に添加する COOH-PLL 濃度により, ガラス化保存した前核期胚の生存率には有意な差はなかった($P > 0.05$). また, 異なる濃度の COOH-PLL を添加した保存液でガラス化保存したブタ前核期胚の発生率(図 9)は, 2・4 細胞期胚への発生率は P0 において 23.1%, P1 において 27.5%, P10 において 37.8%, P20 において 41.7%, P30 において 39.7% であり, P0 および P1 において Fresh (56.7%) と比較して発生率は低下した($P < 0.05$). また, 胚盤胞への発生率は P0 において 1.3%, P1 において 3.8%, P10 において 12.2%, P20 において

19.4%, P30 において 4.8% で, P20 は P0 よりも有意に高く($P < 0.05$), Fresh (28.4%) と有意差のない値を示した($P > 0.05$).

<P20 によりガラス化保存したブタ前核期胚の産子への発育能>

結果より最も胚盤胞への発生能が高かった P20 によりガラス化保存したブタ前核期胚をレシピエント雌ブタに移植し, 産子への発育能を調べた. 8 頭のレシピエントに P20 によりガラス化保存したブタ前核期胚を移植し, そのうちの 2 頭が妊娠し, それぞれ 5 頭および 10 頭の外見上正常な産子を分娩した(表 3) (図 10). 分娩率は 25% であり, 産子率は, 分娩例中の移植胚数に対しては 6.8% (15/222) であった(表 3).

考察

卵や胚のガラス化保存において、保存後の生存性および発生能を左右する要因は様々あり、CPAの種類や濃度、冷却速度、ガラス化の方法、平衡液での平衡時間の検討などが挙げられる(Bagis *et al.*, 2005; Rall, 1987). 本研究では、はじめに平衡液での平衡時間を検討した. ガラス化保存では、CPA濃度が高いためにガラス化液の浸透圧が高く、直接卵や胚をガラス化液へ移すと浸透圧ショックにより細胞が傷害を受け、保存後の生存性や胚の発生能に影響を与える可能性がある. そのため、ガラス化液よりもCPA濃度が低い平衡液へ1から数段階にわけて卵や胚を平衡させることが重要である(Valdez *et al.*, 1990). 最小容量ガラス化法は平衡液での平衡が一段階のみと非常に簡便な方法であるが、このとき平衡時間が不足すると、CPAの透過が充分でないために浸透圧ショックを生じたり、平衡時間が長すぎるとCPAの毒性により細胞が傷害を受ける可能性があり、平衡液での適切な平衡時間を調べることは重要である(Bagis *et al.*, 2005). P0によりガラス化保存したブタ前核期胚の各平衡時間における生存率は、平衡時間10分間でガラス化保存を行った場合に平衡時間5分間と比較して有意に高い生存率を示した. しかし、平衡時間にかかわらず胚の発生率はFreshと比較して有意に低下した. このことからCryotopを用い、ガラス化保存液として30% (v/v) EGを使用したブタ前核期胚のガラス化保存時における平衡液への平衡時間は10分間が適していると考えられるが、発生率はFreshと比較し有意に低下してしまったため、細胞膜保護効果のあるCOOH-PLL (Matsumura & Hyon, 2009)を添加したガラス化保存液を用いたブタ前核期胚のガラス化保存を試みた. COOH-PLLを添加した際に適する平衡時間が変化してしまう可能性を考慮し、マウス卵の研究(Watanabe *et al.*, 2013)において良好な成績を示した10% (v/v) COOH-PLLを添加した保存液(P10)においてP0と同様にガラス化保存時に

おける平衡液への平衡時間を検討した。P10 において各平衡時間における生存率には有意な差は認められなかったが、2・4 細胞期胚への発生率は平衡時間 5 分間および 15 分間では Fresh と比較して有意に低下したこと、胚盤胞への発生率は平衡時間 10 分間において平衡時間 5 分間より有意に高い値を示したことより、COOH-PLL を添加したブタ前核期胚のガラス化保存時における平衡液への平衡時間は 10 分間が適していると考えられる。Somfai らの報告(Somfai *et al.*, 2009)では、前核期胚を 37 °C で平衡液へ 15 分間平衡させている。本研究では P0 および P10 どちらの試験区でも 15 分間の平衡よりも 10 分間の平衡の方が適していたが、本研究では 25 °C で前核期胚を平衡させており、ブタ前核期胚は低温感受性が高く、25 °C で 15 分間平衡を行うと保存後の生存性や発生能に影響を及ぼす可能性が示唆された。そのため、ガラス化保存時における平衡液への平衡時間だけでなく、平衡時の温度に関しても、さらなる研究が必要とされる。

ガラス化保存液中の CPA 濃度が高いほど細胞の浸透圧ショックが生じやすく、濃度が低ければ十分な脱水と CPA の透過が行われぬ。また、CPA の中には毒性をもつものもあり、動物種や卵および胚のステージにより感受性も異なるため、CPA 濃度の検討は重要である。本研究では、COOH-PLL 濃度により生存率に差は出なかったが、P20 において胚盤胞への発生能が高く、Fresh と有意差のない値を示したことから、Cryotop によるブタ前核期胚のガラス化保存において、ガラス化液へ 20% (w/v) COOH-PLL を添加することで胚盤胞への発生能を改善するということが明らかとなった。2009 年に Somfai らが報告したガラス化保存ブタ前核期胚の胚盤胞への発生率は、ガラス化保存を行っていない前核期胚よりも有意に低下していた(Somfai *et al.*, 2009)。これに対し、Somfai らは超低温保存により活性酸素が発生するため、IVC 培地に抗酸化剤である glutathione を添加し、IVC 中の酸化ストレスを軽減することで、ガラス化保存した胚の発生率が有意差は認められないものの向上するこ

とを示している(Somfai *et al.*, 2009). 本研究では 20% (w/v) COOH-PLL を添加したガラス化保存液で保存した前核期胚の胚盤胞への発生率は, Fresh と有意差のない発生率を示しており, COOH-PLL が超低温保存により生じる活性酸素を軽減している可能性が示唆され, さらなる研究が必要であると考えられる.

体外での胚の発生能の結果をもとに, COOH-PLL 濃度検討で最も良好な発生能を示した P20 によりガラス化保存した前核期胚を胚移植することにより, 本法によりガラス化保存したブタ前核期胚が産子への発育能を有するかを検討した. 8 頭のレシピエントにそれぞれ胚移植したところ, 2 頭が分娩に至ったことから, 本法によりガラス化保存したブタ前核期胚は産子への発育能を有し, ブタ前核期胚の保存に有効であることが示された.

COOH-PLL どのように作用し, ガラス化保存後のブタ前核期胚の発生能を改善したかは本研究からは明らかにはなっていない. COOH-PLL を開発した松村らは, COOH-PLL は従来 CPA として用いられてきた DMSO より毒性が低いことや, 氷晶形成を抑制する効果に優れていることなどを報告している (Matsumura & Hyon, 2009) が, COOH-PLL がどのようにして CPA として作用するのか詳細なメカニズムは明らかにはしていない. 本研究において, COOH-PLL を含むガラス化保存液へ暴露したブタ前核期胚の発生率は Fresh と比較して有意差はなく, また, 添加する COOH-PLL 濃度を変えても発生率に有意差は見られなかったことから, COOH-PLL がブタ前核期胚の発生能に影響を及ぼしている可能性は低いと考えられる. COOH-PLL は細胞膜非浸透性の CPA であり, マウス卵の研究 (Watanabe *et al.*, 2013) では, COOH-PLL 単体では保存後の胚の発生能は低下してしまうことが示されているため, EG のような細胞膜透過性の CPA と組み合わせることが重要である. 一般的に Cryotop 法による胚のガラス化保存に用いられる細胞膜透過性の CPA は EG と DMSO を組み合わせて使用する (Kuwayama, 2007) が, 前述の

ように DMSO は毒性が高いことが知られており、本研究では Cryotop 法によるマウス卵のガラス化保存(Kohaya *et al.*, 2013)の方法を参考に、コントロールとして CPA に 30% (v/v) EG のみを添加したガラス化保存液(P0)を使用した。しかし、本研究において P0 によりガラス化保存したブタ前核期胚の胚盤胞への発生能は低く、ブタ前核期胚においては 30% (v/v) EG のみでは CPA が不十分であることが考えられた。そこで、毒性の少ない COOH-PLL を CPA として追加したことで、胚が CPA から受ける毒性を低く保ったまま、かつ十分な凍害保護効果を得られたことがガラス化保存後のブタ前核期胚の発生能を改善したのではないかと考えられる。また、マウス卵の報告(Watanabe *et al.*, 2013)では COOH-PLL は膜透過性の CPA である EG による浸透圧の急激な上昇を緩やかにしているとの可能性を示唆しているが、COOH-PLL が CPA として作用するメカニズムについてさらなる研究が必要である。今後、現在確立されていない動物種の卵や胚のガラス化保存において、COOH-PLL の CPA としての有用性に関して、また、COOH-PLL を用いた毒性の低い保存液による、ヒトの卵や胚の保存に関しての発展が望まれる。

第二章

ブタ前核期胚への CRISPR/Cas9 システム導入条件の検討

序論

家畜では、生殖細胞に分化する幹細胞が樹立していないことから、ゲノム編集が登場する以前の KO 動物作製は、相同組み換えした体細胞を核移植し、産子を得る方法が適用されていた(Sendai *et al.*, 2006; Richt *et al.*, 2007). しかし、体細胞での相同組み換え率は非常に低いことや、核移植は高度な技術を要し、核移植胚の発生率は低いことから、家畜において KO 動物の研究はあまり進まなかった. 1996 年にはじめてゲノム編集技術のひとつである ZFN が報告されて以来(Kim *et al.*, 1996), ショウジョウバエ(Bibikova *et al.*, 2002), ゼブラフィッシュ(Meng *et al.*, 2008), ウサギ(Flisikowska *et al.*, 2011), ウシ(Yu *et al.*, 2011), ブタ(Hauschild *et al.*, 2011)など、従来の方法では作出が困難であった動物種で遺伝子改変動物の作製が盛んに行われるようになった. しかし、ZFN は前述のように 1 つのジンクフィンガーが 3 塩基を認識するため、目的の配列を認識するには制限があった. TALEN は 1 つのモジュールが 1 塩基を認識可能なため、標的配列の自由度が ZFN よりも高く、登場後すぐに様々な動物種において TALEN による遺伝子改変動物の作製が相次いで報告された(Tesson *et al.*, 2011; Sung *et al.*, 2013; Lillico *et al.*, 2013). しかし、CRISPR/Cas9 システムの登場によりさらに簡便に標的配列の認識を行うことが可能となった. Cas9 が標的配列を認識するためには、PAM と呼ばれる配列が必要となるが、ゲノム編集に広く使用される Cas9 の PAM は 5'-NGG-3'であり、GG の配列があれば理論上ゲノム中のどこでも標的とすることが可能である. ただし、厳密な特異性を有するのは PAM とその 5'側の 12-13 塩基であると言われており(Cong *et al.*, 2013; Jinek *et al.*, 2013), 一般には、PAM の上流 20 塩基を標的配列として Cas9 を呼び込む gRNA を設計する. 以上のように、CRISPR/Cas9 システムでは ZFN や TALEN のように標的配列に対応する DNA 結合ドメインを作製することなく、標的配列を 20 塩基程

度のオリゴヌクレオチドとして設計するだけで目的の配列の破壊を行うことができるため、非常に簡便かつ迅速に KO 細胞や動物を作製することが可能である。さらに、ZFN や TALEN において、標的配列を認識する DNA 結合ドメインを作製する際には、標的配列の選定に制限があり、ゲノム上のどこでも標的配列とすることは困難であったのに対し、CRISPR/Cas9 システムでは、標的配列は GG の配列さえあれば、ゲノム上どこでも標的とすることが可能で、自由度が非常に高い点も利点である。しかし、その一方で類似の配列を認識し切断してしまう off-target 効果も高い(Zhao *et al.*, 2017)ため、標的配列の選定には慎重になる必要がある。最近では、予め特異性の高い配列を検索可能な CRISPR direct (<http://crispr.dbcls.jp/doc/>)などのツールが登場し、off-target 効果の発生頻度を考慮しつつ標的配列の選定を簡便に行えるようになった。

CRISPR/Cas9 システムによって KO 動物を作製する場合は、一般的に前核期胚に gRNA と Cas9 をプラスミド、mRNA、あるいはタンパク質の状態で顕微注入し、胚移植後に産子を得る。この方法は核移植よりも発生率が高く、変異導入率も非常に高く、マウスやラットでは高率に KO 動物を作製することが可能である(Shen *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013)。しかし、ブタにおいては先行研究の多くが体細胞をゲノム編集し、核移植を経て胚移植後に産子を作出している(Li *et al.*, 2015; Butler *et al.*, 2016; Bi *et al.*, 2016; Niu *et al.*, 2017)。この理由として、ブタでは前核期胚に顕微注入する際の核酸の濃度や核酸の形態についての至適条件は明らかにされていないことが、ひとつの要因であると考えられる。そこで、第二章では、マウスにおいて着床に必須であるとされる LIF を標的とした gRNA の作製を行い、作製した gRNA および Cas9 mRNA あるいはタンパク質を前核期胚に注入し、その後の体外での発生能および胚盤胞のゲノム変異率を調べた。標的遺伝子とした LIF は、一般に哺乳類の胚着床に必須であると知られて(Blitek *et al.*, 2012)おり、妊娠初

期に分泌された Estrogen により LIF が産生され, LIF 受容体と GP130 の複合体に LIF が結合すると, シグナル伝達と転写活性化を行う STAT3 が活性化し, 子宮は胚を受容可能な状態になる(Nakamura *et al.*, 2006). LIF KO 雌マウスは胚着床不全を伴う不妊になるため(Stewart *et al.*, 1992), LIF は胚着床に必須であると考えられているが, ブタで実際に LIF が着床に必須であるかは明らかではなく, LIF KO ブタの作製が望まれている. そのため, 本研究では LIF を標的遺伝子として, 実験を行った.

材料および方法

本実験は、麻布大学組換え DNA 実験安全委員会の承認(ID#17-8)および動物実験委員の承認 (ID#170324-9)を得て行った。

<LIF を標的とした CRISPR/Cas9 gRNA の作製>

ブタ LIF (AJ296176)は 3 つの Exon からなり, 202 アミノ酸をコードする(図 9 A)。ブタ LIF 遺伝子上の標的配列は CRISPR direct (<http://crispr.dbcls.jp/doc/>)を使用して PAM 配列から上流 20 塩基, かつブタゲノム上に類似の配列が少なく off-target 効果が起こり難いと考えられる領域 3 つを候補として選定した(図 9B)。Cas9 と gRNA を共発現するベクターである pX330 (Addgene. Cambridge, MA)を選別した 3 つの標的候補配列についてそれぞれ作製するため, pX330 が有する BbsI の制限酵素サイトを含む標的候補配列およびその相補鎖をオリゴヌクレオチドとして入手した(Invitrogen. Carlsbad, CA)。標的配列と相補鎖のペアとなるオリゴヌクレオチドはそれぞれ 10 μ M に調整し, 95°C で 5 分間, 室温で 10 分間インキュベートすることでアニーリングを行った。pX330 は BbsI 処理し, アニーリングしたオリゴヌクレオチドと 16°C で 16 時間インキュベートすることでライゲーション反応を行った。ライゲーション反応液は, コンピテントセル(DH-5 α ; NIPPON GENE. Tokyo, Japan)と懸濁しトランスフォーメーションを行い, LB 寒天培地に塗抹して 37°C で 16 時間培養した。得られたコロニーを液体培地にて培養し, QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen. Hilden, Germany)によりプラスミドを抽出した (gRNA-pX330, gRNA②-pX330 および gRNA③-pX330)。

<pCAG-EGxxFP による gRNA の切断活性評価>

最も切断効率の高い gRNA を選別するため, pCAG-EGxxFP (RIKEN

BRC DNA Bank. Ibaraki, Japan)による切断活性評価を行った(Mashiko *et al.*, 2013). ブタの尾を 2 mm 角に切り出し, 0.2 N NaOH-1% SDS 中で 97°C 10 分間インキュベーションした後に攪拌し, 尾が完全に溶解するまで繰り返した. 得られた溶液を 1/100 希釈し PCR の鋳型に用いた. 候補となる 3 つの標的配列を含むブタ LIF と pCAG-EGxxFP をライゲーションするため, Forward プライマーの 5' 側に BamHI サイトを, Reverse プライマーの 3' 側に EcoRI サイトを有する, gRNA を含む LIF を増幅するように設計したプライマー(図 10)を設計し, PCR に用いた. PCR は, Tks Gflex™ DNA Polymerase (TAKARA BIO. Shiga, Japan)を用いて行った. PCR purification kit (Qiagen. Hilden, Germany)により精製した PCR 産物と pCAG-EGxxFP を制限酵素 BamHI (TAKARA BIO. Shiga, Japan)および EcoRI (TAKARA BIO. Shiga, Japan)で処理し, ライゲーション反応を行った. ライゲーション反応, トランスフォーメーションおよびプラスミドの抽出方法は gRNA-pX330 の作製と同様に行った. 作製したプラスミドは, LIF-pCAG-EGxxFP①, LIF-pCAG-EGxxFP②および LIF-pCAG-EGxxFP③とした. LIF-pCAG-EGxxFP①-③と gRNA-pX330①-③を HEK293 細胞に Lipofectamine LTX and Plus Reagent (Invitrogen. Carlsbad, CA)を用いてリポフェクションし, 炭酸ガスインキュベーター中にて 38.5°C, 5% CO₂, 95% air, 湿度飽和の条件下で培養した. また, トランスフェクション時にプラスミドを添加せずにトランスフェクション試薬のみを添加した Negative control, および LIF をライゲーションしなかった pCAG-EGxxFP についても同様に HEK293 細胞へのトランスフェクションを行い, 同様の条件下で培養した. 48 時間後蛍光顕微鏡下で GFP の発現を観察した. GFP を発現し緑色蛍光を示す細胞の数が最も多い gRNA①を以降の実験に用いた.

<前核期胚に注入する gRNA, Cas9 mRNA の調整>

gRNA①の標的配列のオリゴヌクレオチドを, T7 プロモーターを有する

DR274 ベクター(Addgene. Cambridge, MA)にライゲーションした(gRNA①-DR274). gRNA①-DR274 は MEGAshortscript™ T7 Transcription Kit (Invitrogen. Carlsbad, CA)により *In vitro* 転写を行い, フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿により精製を行った. Cas9 は, T7 プロモーターを有する Cas9 発現ベクターMLM3613(Addgene. Cambridge, MA)を mMESSAGING mMACHINE T7 Ultra Kit (Invitrogen. Carlsbad, CA)により *In vitro* 転写し, 作製した mRNA を塩化リチウム沈殿により精製した. 作製した mRNA は使用の直前まで-80°Cで保存した.

<前核期胚の作出>

前核期胚は第一章と同様の方法で作製した. すなわち, 既報(Kikuchi *et al.*, 2002)に従い IVM および IVF を行い, 遠心処理後に 2-3 前核形成をしている胚を前核期胚とし, 実験に供した.

<前核期胚への LIF gRNA および Cas9 mRNA の顕微注入>

gRNA および Cas9 mRNA は, RNase Free Water (TAKARA BIO. Shiga, Japan)で希釈し, それぞれ最終濃度 5 ng/μL (R5), 12.5 ng/μL (R12.5), 25 ng/μL (R25)および 50 ng/μL (R50)に調整し, 前核期胚に注入した. 注入胚は第一章と同様の方法で培養し, IVF の 48 時間後に生存率と 2 および 4 細胞期胚への発生率, 168 時間後に胚盤胞への発生率を評価した. また, コントロールとして無処理の前核期胚, また, RNA を希釈する RNase Free Water のみを注入した Sham についても, 同様に生存率と発生率を評価した. 胚盤胞は回収し, ゲノムシーケンスに用いた.

<前核期胚への gRNA および Cas9 タンパク質の顕微注入>

Cas9 タンパク質(cat# B25640; Thermo Fisher Scientific. Waltham, MA)

および gRNA は, T₁₀E_{0.1} (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 mM EDTA) で希釈し, それぞれ最終濃度 10 ng/μL (Pro10), 25 ng/μL (Pro25) および 50 ng/μL (Pro50) に調整し, 前核期胚に注入した (Mashiko *et al.*, 2014). <前核期胚への gRNA および Cas9 mRNA の顕微注入>と同様に生存率および発生率を調べ, 回収した胚盤胞はゲノムシーケンスに用いた.

<胚盤胞のゲノムシーケンス>

回収した胚盤胞を 5 μL の 0.2 N NaOH-1% SDS 中で 10 分間 97°C に加熱し, 攪拌した. 得られた溶液を 1/100 希釈し PCR の鋳型に用いた. Forward primer: 5'-GACGGGGATCCCTGCTAAATAT-3' および Reverse primer: 5'-AAGTGTCCGTGTGTCTGCAG-3' を用い, Tks Gflex™ DNA Polymerase (TAKARA BIO. Shiga, Japan) により PCR を行った. 得られた PCR 産物は PCR purification kit (Qiagen. Hilden, Germany) により精製し, 受託シーケンスサービス (Sigma-Aldrich Corporation. St. Louis, MO) に提出し, ゲノムシーケンスを行った.

<統計処理>

統計処理は第一章と同様に行った. 即ち, データとして得られた % データは, アークサインにより角変換し, 統計処理に用いた. 統計は Kruskal-Wallis test を行い, 有意差が認められたデータは次いで Scheffe's method により, 各群の比較を行った. また, 胚盤胞のゲノム変異率は, Dunnett's test により比較を行った.

結果

<pCAG-EGxxFP による LIF gRNA の活性評価>

作製した LIF-pCAG-EGxxFP および gRNA-pX330①, ②, ③をそれぞれ HEK293 細胞にトランスフェクションした結果, gRNA-pX330①において最も多くの細胞が緑色蛍光を示した(図 11). Negative control および pCAG-EGxxFP のみをトランスフェクションした HEK293 細胞は蛍光を示さなかった(図 11).

<異なる濃度の LIF gRNA および Cas9 mRNA を注入したブタ前核期胚の生存性および体外発生能>

異なる濃度の LIF gRNA および Cas9 mRNA を注入したブタ前核期胚の生存率は, 無処理において 100%, Sham において 77.6%, R5 において 61.7%, R12.5 において 64.6%, R25 において 67.6%, R50 において 67.9% であり, Sham を含む顕微注入を行ったすべての試験区において生存率は低下した($P < 0.05$) (図 12). また, 発生率は, 2・4 細胞期胚への発生率は無処理において 57.5%, Sham において 40.0%, R5 において 38.2%, R12.5 において 29.1%, R25 において 30.3%, R50 において 34.0% であり, R12.5, R25 および R50 では発生率は有意に低下した($P < 0.05$) (図 12). また, 胚盤胞への発生率は無処理において 34.2%, Sham において 16.5%, R5 において 17.7%, R12.5 において 18.2%, R25 において 17.5%, R50 において 14.4% であり, 試験区間に有意な差はみられなかった($P > 0.05$) (図 12).

<異なる濃度の LIF gRNA および Cas9 タンパク質を注入したブタ前核期胚の生存性および体外発生能>

異なる濃度の LIF gRNA および Cas9 タンパク質を注入したブタ前核期胚

の生存率は、無処理において 100%, Sham において 81.8%, Pro10 において 72.7%, Pro25 において 75.0%, Pro50 において 64.3%であり, Sham を含む顕微注入を行ったすべての試験区において生存率は低下した($P < 0.05$) (図 13). また, 発生率は, 2・4 細胞期胚への発生率は無処理において 44.4%, Sham において 31.8%, Pro10 において 27.3%, Pro25 において 23.2%, Pro50 において 23.2%であり, 試験区間に有意差はみられなかった($P > 0.05$) (図 13). また, 胚盤胞への発生率は無処理において 28.9%, Sham において 11.4%, Pro10 において 9.1%, Pro25 において 14.3%, Pro50 において 12.5%であり, 試験区間に有意な差はみられなかった($P > 0.05$) (図 13).

<異なる濃度の LIF gRNA および Cas9 mRNA を注入したブタ前核期胚由来胚盤胞のゲノム変異率>

胚盤胞からゲノムを抽出し, PCR を行ったところ 280 bp 付近にバンドを確認した(図 14A). 異なる濃度の LIF gRNA および Cas9 mRNA を注入したブタ前核期胚由来胚盤胞のゲノム変異率は, R5 において 7.7% (1/13), R12.5 において 40.0% (6/15), R25 において 50.0% (6/12), R50 において 12.5% (2/16)であり, R25 が最も高い変異率を示した($P < 0.05$) (表 4). また, 変異が生じたゲノムはすべてヘテロでの変異であった(図 14B).

<異なる濃度の LIF gRNA および Cas9 タンパク質を注入したブタ前核期胚由来胚盤胞のゲノム変異率>

異なる濃度の LIF gRNA および Cas9 mRNA を注入したブタ前核期胚由来胚盤胞のゲノム変異率は, Pro25 において 83.3% (5/6), Pro50 において 100% (1/1)であった(表 5). また, Pro25 では, 両アレルに 1 塩基の欠失が生じた胚がみられた(図 15).

考察

ゲノム編集技術の誕生により、幹細胞や体細胞での相同組み換えを介することなく、直接受精卵である前核期胚の前核や細胞質に核酸を注入するだけで遺伝子改変動物を作出することが可能となった。特に、体細胞では相同組み換え率が非常に低いことや核移植後の胚の発生率が低いことから、家畜では遺伝子改変動物の作出やその研究の報告は少なく(Watanabe *et al.*, 2013), ゲノム編集技術の誕生によりブタをはじめとする様々な家畜での遺伝子改変動物の作出報告が急速に増加している(Bhat *et al.*, 2017)。しかし、ブタでは多くの報告においてゲノム編集した体細胞を核移植する煩雑な方法を介して遺伝子改変動物を作出している(Li *et al.*, 2015; Butler *et al.*, 2016; Bi *et al.*, 2016; Niu *et al.*, 2017)ことから、ブタ前核期胚への核酸の注入条件を明らかにすることが重要であると考えられた。本研究では、LIF を標的とした CRISPR/Cas9 システムにおいて、ブタ前核期胚に注入する濃度を検討した。その結果、12.5 ng/ μ L 以上の gRNA および Cas9 mRNA を注入することで 2・4 細胞期胚への発生率は低下したことから(図 12)、高濃度の gRNA および Cas9 mRNA の注入は胚の発生能に影響を及ぼす可能性が示唆された。Mashimo らは、高濃度の TALEN mRNA をラット前核期胚に注入するとその後の胚発生率が低下することを示しており、2 ng/ μ L と低濃度での注入により KO ラットを作製している(Mashimo *et al.*, 2013)。しかし本研究においては、25 ng/ μ L の gRNA および Cas9 mRNA を注入した前核期胚由来胚盤胞の遺伝子変異導入率は高い値を示したため(表 4)、ブタにおいては低濃度もしくは高濃度の RNA ではゲノム変異率は低下する可能性が示唆された。一方、gRNA および Cas9 タンパク質注入試験では、本研究で用いた 10, 25 および 50 ng/ μ L の濃度では発生能へ影響を及ぼさないことが示唆された(図 13)。また、高いゲノム変異率を示し、特に 25 ng/ μ L gRNA + Cas9 タンパク質を注入

した前核期胚由来胚盤胞のゲノムでは両アレルに1塩基の欠失が起きていることが確認された(図 15). Whitworth らは CRISPR/Cas9 において, 10 ng/ μ L より高濃度の gRNA および Cas9 mRNA の注入を注入したブタ前核期胚は胚盤胞への発生率が低下することを示している(Whitworth *et al.*, 2014)が, 本研究の結果では gRNA および Cas9 mRNA の注入において 5, 12.5, 25 および 50 ng/ μ L の濃度はブタ前核期胚の胚盤胞への発生率に影響を及ぼさないことを示した(図 12). また, gRNA および Cas9 タンパク質の注入において 10, 25 および 50 ng/ μ L の濃度では胚盤胞への発生に影響を及ぼさないことを示した(図 13). しかし, マウス胚において高濃度の核酸の注入は発生率を低下させること(Brinster *et al.*, 1985)が報告されており, ブタにおける CRISPR/Cas9 システム適用時の胚への核酸の注入濃度は慎重に決定する必要があると考えられる. 本研究では直接 Cas9 の mRNA およびタンパク質を注入した前核期胚の発生能やゲノム変異率を比較してはいないため, Cas9 において mRNA あるいはタンパク質のどちらが最適かは明らかにはならなかった. 一般的に, Cas9 タンパク質の方が翻訳にかかる時間がないために, ゲノム変異を起こす効率は高いと考えられている(Tanihara *et al.*, 2016). しかし, 本研究において, 胚盤胞の遺伝子型解析により両アレルに変異が生じた胚は1つしか確認されなかった. マウスにおいて, アンチセンスオリゴヌクレオチドにより LIF の発現を制御した胚では, 胚盤胞への発生率が低下するということが報告されており(Cheng *et al.*, 2004), 初期胚の発生には LIF が大きな役割を果たしている可能性が高い. そのため, 本研究においても, LIF が KO された胚では胚盤胞へ発生しなかった, あるいは発生率が低下した結果, 解析した胚盤胞に両アレルでのゲノム変異胚は少なかった可能性が考えられた. しかし, マウスでは LIF KO マウスは胚性致死ではないことから, 初期胚の発生過程における LIF の役割についても, さらなる研究が必要である.

第三章

ガラス化保存ブタ前核期胚への gRNA および Cas9 注入後における 発生能の検討

序論

ゲノム編集技術により、様々な動物種において KO や KI 動物などのゲノム編集した動物を作出する可能性が示された。しかし、家畜としてあるいは実験動物として重要なブタに対して効率的にゲノム編集などによる遺伝子改変を行うためには、個体へ発生しうるブタ生殖系列のどの細胞をゲノム操作する対象とするか、さらにその細胞をどのように効率的に供給するかが課題である。ブタはゲノム編集時に材料となる前核期胚の採取において、体内由来胚では外科的手術を介するため(Hisamatsu *et al.*, 2015), 特別な施設や技術を要することやコストが高いことが問題であるが、体外由来胚では体外受精率や発生率に未だ改善の余地がある(Romar *et al.*, 2016). さらに、前核期胚の胚移植では移植した胚の 10%程度しか産子へ発育しないことから(Somfai *et al.*, 2012), ゲノム編集を行う前に予め前核期胚を超低温保存することで多量にストックを作製することができれば、非常に有用である。第一章でブタ前核期胚の超低温保存法を改良しうることを示した。しかしながら、超低温保存後の前核期胚に対するゲノム編集を施すための顕微注入などの操作がその後の発生のに及ぼす影響について検討する必要がある。ガラス化の操作は細胞への傷害を引き起こすことが知られており(Arav, 2014), また、同様に顕微注入も胚に直接ピペットを挿入することから細胞にダメージを与えるため(Kaneko *et al.*, 2014), 発生能の低下が懸念される。特に、ブタ前核期胚のガラス化保存は難しいことから、ガラス化保存したブタ前核期胚へ顕微注入したという報告はされていない。そこで、第三章では 20% (w/v) COOH-PLL 添加保存液によりガラス化保存したブタ前核期胚に gRNA および Cas9 mRNA あるいはタンパク質を注入し、その後の生存性および発生能を評価した。また、新鮮あるいは 20% (w/v) COOH-PLL 添加保存液によりガラス化保存した前核期胚へ第二章で良好な発生能およびゲノム変異率を示した 25 ng/ μ L

gRNA + Cas9 タンパク質を注入し, 胚移植後に胎子の有無による着床の確認を行った. さらに, ブタ胚盤胞での LIF および LIF 受容体の発現を調べた.

材料および方法

本実験は、麻布大学組換え DNA 実験安全委員会の承認(ID#17-8)および動物実験委員の承認 (ID#170324-9)を得て行った.

<試薬>

使用した試薬は特別な記載がない限り, 全て Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA)から購入した.

<ガラス化保存ブタ前核期胚への LIF gRNA および Cas9 mRNA あるいはタンパク質の顕微注入>

第一章と同様の方法で作製した前核期胚を, 良好な体外発生率を示した 20% (w/v) COOH-PLL 添加保存液でガラス化保存し, 加温の 2 時間後に顕微注入に供した. Cas9 mRNA 注入時は, gRNA および Cas9 mRNA は RNase Free Water で希釈し, それぞれ最終濃度 12.5 ng/ μ L (R12.5), 25 ng/ μ L (R25)および 50 ng/ μ L (R50)に調整し, 前核期胚に注入した. また, Cas9 タンパク質注入時は, gRNA および Cas9 タンパク質は T₁₀E_{0.1} で希釈し, それぞれ最終濃度 10 ng/ μ L (Pro10), 25 ng/ μ L (Pro25)および 50 ng/ μ L (Pro50)に調整し, 前核期胚に注入した. 生存率, 発生率およびゲノム変異率は第二章と同様の方法で調べた.

<LIF gRNA および Cas9 タンパク質注入胚の胚移植>

胚移植の方法は第一章と同様, 既報(Hisamatsu *et al.*, 2015)に従い行った. 新鮮あるいは 20% (w/v) COOH-PLL 添加保存液によりガラス化保存した前核期胚へ 25 ng/ μ L gRNA+Cas9 タンパク質を顕微注入した. 注入後直ちに前核期胚を 5 mL ポリプロピレンラウンドチューブに入れた 20 mM HEPES を

添加した IVC-PyrLac 中へ移し, 38.5°C に調整した魔法瓶に入れて保温し豚舎に運搬した. ブタ前核期胚は外科的にレシピエント雌ブタの卵管へ移植した. 前核期胚を移植したレシピエント雌ブタは, 28 日後に子宮を採取し, 胎子の有無により着床を確認した.

<ブタ胚盤胞における LIF および LIF 受容体の免疫蛍光染色>

免疫蛍光染色は既報(Hirose *et al.*, 2013)に従った. IVF 後に得られた胚盤胞を回収し, 0.1% (w/v) PVA を添加した PBS(PBS-PVA)で三回洗浄した. 2% (w/v) PFA および 0.2% (v/v) triron X-100 を添加した PBS-PVA に胚盤胞を移動し, 室温で 40 分静置した. 1 mL の PBS-PVA 中に胚盤胞を移動し, 15 分間×3 回洗浄した. 2.5% (v/v) PlusOne Tween 20 (GE Healthcare. Little Chalfont, UK)を添加した PBS-PVA へ胚盤胞を移動し, 2 分間静置した. 1 mL の PBS-PVA 中に胚盤胞を移動し, 15 分間×3 回洗浄した. 1% (w/v) BSA を添加した PBS-PVA 中(PBS-PVA-BSA)に胚盤胞を移動し, 2-24 時間 4°C で保存した. 10% (v/v) Goat Serum (COSMO BIO. Tokyo, Japan)を添加した PBS-PVA-BSA に胚盤胞を移動し, 室温で 40 分静置した. 一次抗体として, LIF antibody rat monoclonal IgG (39N7D10; Novus Biologicals. Littleton, CO)あるいは Anti-LIFR antibody rabbit polyclonal IgG (ab101228; abcam. Cambridge, UK)をそれぞれ PBS-PVA-BSA で 100:1 希釈し, 胚盤胞を移動し 4°C で overnight した. ネガティブコントロールとして, 一部の胚盤胞は一次抗体なしの PBS-PVA-BSA 中で overnight した. 1 mL の PBS-PVA-BSA 中に胚盤胞を移動し, 15 分間×3 回洗浄した. 二次抗体として, Alexa Fluor[®] 488 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen. Carlsbad, CA) を PBS-PVA-BSA で 100:1 希釈し, 胚盤胞を移動して 1 時間室温で静置した. 1 mL の PBS-PVA-BSA 中に胚盤胞を移動し, 15 分間×3 回洗浄した. PI (LIVE/DEAD[®] Sperm Viability kit: Thermo Fisher Scientific. Carlsbad,

CA)を PBS-PVA-BSA で 100:1 希釈し, 胚盤胞を移動して 1 時間室温で静置し, 核の染色を行った. 1 mL の PBS-PVA-BSA 中に胚盤胞を移動し, 15 分間×3 回洗浄した. スライドガラス上に胚盤胞を置き, VECTASHIELD Mounting Medium (VECTOR Laboratories. Burlingame, Ca)を用いて封入した. 観察は共焦点レーザー顕微鏡(TCS-SP5 ver2.0: Leica. Wetzlar, Germany)により行い, Z 方向に一つの胚盤胞につき 15 μm の厚さで 10 カット撮影した画像を重ね合わせて観察を行った.

<統計処理>

統計処理は第一章と同様に行った. 即ち, データとして得られた%データは, アークサインにより角変換し, 統計処理に用いた. 統計は, Kruskal-Wallis test を行い, 有意差が認められたデータは次いで Scheffe's method により, 各群の比較を行った.

結果

<異なる濃度の LIF gRNA および Cas9 mRNA を注入したガラス化保存ブタ前核期胚の生存性および体外発生能>

LIF gRNA および Cas9 mRNA を注入したブタ前核期胚の生存率は、無処理において 100%、Sham において 8.3%、R12.5 において 31.8%、R25 において 31.6%、R50 において 50.0%であり、Sham において生存率は低下した($P < 0.05$) (図 16). また、発生率は、2・4 細胞期胚への発生率は無処理において 36.4%、Sham において 0%、R12.5 において 22.7%、R25 において 21.1%、R50 において 31.8%であり、試験区間に有意な差はみられなかった($P > 0.05$) (図 16). また、胚盤胞への発生率は無処理において 9.1%、Sham において 0%、R12.5 において 13.6%、R25 において 0%、R50 において 9.1%であり、試験区間に有意な差はみられなかった($P > 0.05$) (図 16). また、R12.5 において、胚盤胞のゲノムシーケンスの結果、片側のアレルにゲノム変異が起きていることを確認した(図 18).

<異なる濃度の LIF gRNA および Cas9 タンパク質を注入したガラス化保存ブタ前核期胚の生存性および体外発生能>

LIF gRNA および Cas9 タンパク質を注入したブタ前核期胚の生存率は、無処理において 59.5%、Sham において 32.4%、Pro10 において 27.0%、Pro25 において 34.2%、Pro50 において 16.2%であり、試験区間に有意な差はみられなかった($P > 0.05$) (図 17). また、発生率は、2・4 細胞期胚への発生率は無処理において 29.7%、Sham において 5.4%、Pro10 において 8.1%、Pro25 において 13.2%、Pro50 において 2.7%であり、試験区間に有意な差はみられなかった($P > 0.05$) (図 17). また、胚盤胞への発生率は無処理におい

て 5.4%, Sham において 5.4%, Pro10 において 5.4%, Pro25 において 7.9%, Pro50 において 2.7% であり, 試験区間に有意な差はみられなかった ($P > 0.05$) (図 17).

<LIF gRNA および Cas9 タンパク質を注入したブタ前核期胚の胚移植>

胚移植を行った 28 日後に子宮を回収(図 19)した結果, 移植した 5 頭中 5 頭とも胎子はみられず, 着床を確認することはできなかった(表 6).

<ブタ胚盤胞における LIF および LIF 受容体の発現と局在>

免疫蛍光染色の結果, ブタ胚盤胞においては LIF および LIF 受容体が発現していることが観察された(図 20 および 21). また, LIF は細胞膜周辺が強く蛍光を示し, LIF 受容体は細胞質全体が蛍光を示した(図 20 および 21).

考察

ブタ前核期胚は低温感受性が高く、超低温保存が難しい(Somfai *et al.*, 2009). マウスではガラス化保存した前核期胚に顕微注入を行っており(Nakagawa *et al.*, 2015), ヒト不妊治療では超低温保存した未授精卵を顕微授精に用いている(Nagy *et al.*, 2017). しかし, ブタでは超低温保存した胚に顕微注入などの操作を施した報告はされていない. そこで, 超低温保存したブタ前核期胚の CRISPR/Cas9 システムの導入後における発生能を明らかにする必要があると考えられた. ガラス化保存したブタ前核期胚へ gRNA および Cas9 mRNA を注入した結果, Sham の生存率は低下したものの, 注入濃度は発生能には影響を及ぼさないことが示された(図 16). また, gRNA およびタンパク質を注入した結果, Pro50 では生存率および 2・4 細胞期胚率が低下したものの, 胚盤胞への発生には影響を及ぼさないことが示された(図 17). 以上より, 本研究においてガラス化保存したブタ前核期胚が CRISPR/Cas9 システムの導入後に胚盤胞へ発生することをはじめて明らかにした. しかし, 本研究では Cas9 mRNA の注入では Sham および R25 において胚盤胞への発生が確認できなかったことから, すべての試験区で胚盤胞までの発生が確認された Cas9 タンパク質を注入することでより安定的に胚盤胞を作出できる可能性が示唆された. 一方, R10 では胚盤胞のゲノムシーケンスの結果, 片側のアレルではあるもののゲノム変異が確認された(図 18). ガラス化保存前核期胚において gRNA および Cas9 注入後に胚盤胞へ発生能を有することが確認され, さらにその胚盤胞のゲノムに変異が導入されていたことから, 新鮮およびガラス化保存前核期胚へ, 第二章で良好な発生能およびゲノム変異率を示した 25 ng/ μ L gRNA + Cas9 タンパク質を注入し, 胚移植を行ない胎子の作出を試みた. 通常, ブタでは妊娠 21 日から 35 日にかけて胎子重量は約 0.2 g から約 4.0 g まで発育する(Langendijk *et al.*, 2016). そのため, 胚移植

28 日目にレシピエントブタの子宮を回収し(図 19), 子宮角を切り開いて胎子の有無を調べた. しかし, 新鮮およびガラス化保存前核期胚のどちらを移植したレシピエント個体からも, 胎子は得られなかった(表 6). そこで, 胚発生中の LIF に着目した. マウス(Cheng *et al.*, 2004)やウシ(Mo *et al.*, 2014)では, 初期胚の発生に LIF が関与していることが示唆されていることや, マウスでは胚盤胞に LIF が発現していること(Cheng *et al.*, 2016)から, ブタにおいて胚盤胞以降の発生に LIF が関与している可能性が考えられた. そこで, ブタ胚盤胞の LIF および LIF 受容体を免疫蛍光染色し, その発現と局在を調べた. その結果, LIF は主に細胞膜付近に強い蛍光を示しており(図 20), LIF 受容体は細胞質全体が蛍光すること(図 21)から, ブタ胚盤胞に LIF および LIF 受容体が発現しており, LIF は胚盤胞以降の発生に関与している可能性が示唆された. また, 先行研究において妊娠 12 日目のブタの胚を含む子宮灌流液の LIF mRNA は上昇することが報告されている(Blitek *et al.*, 2012). ブタにおいて, 妊娠 12 日目では母体の妊娠認識が起こる時期と言われており, 一般的には胚が分泌するエストロゲンのシグナルを母体が受け取ることで妊娠が維持されると考えられている(Blitek *et al.*, 2012). LIF はエストロゲンがエストロゲン受容体に結合することで分泌するため(Cha *et al.*, 2012), ブタにおいては妊娠中に胚から LIF が分泌されることが妊娠の維持に関与する可能性が考えられる. そのため, 本研究においても LIF が片側もしくは両側アレルで変異した結果, 妊娠維持されず胎子の発育まで至らなかった可能性が示唆される. しかし, 本研究において LIF gRNA および Cas9 タンパク質を注入した前核期胚は胚盤胞へ発生したものの, 胎子へ発生しなかった要因としては, 胚移植の技術的な要因やレシピエントの個体要因あるいは妊娠中の環境要因なども否定できないため, 胚発生中の LIF の機能についてさらなる研究が求められる.

総合考察

1996年にはじめてゲノム編集技術の ZFN (Kim *et al.*, 1996)が登場して以来, 2010年には TALEN (Boch *et al.*, 2010), 2012年には CRISPR/Cas9 (Jinek *et al.*, 2012)が相次いで報告され, 体細胞核移植を経る従来法では遺伝子改変動物の作製が困難であった種において KO/KI 動物の作出についての研究が急速に発展した. マウスやラットなどの実験動物では様々な遺伝子の KO 動物の作出が行われており, ダブル KO やトリプル KO の作出も多数報告されている(Wang *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013). マウスやラットではゲノム編集を行う際の材料となる前核期胚の採取は過剰排卵処置を施した雌を雄と交配させ, 卵管より受精卵を回収することが一般的である. また, ゲノム編集した胚を移植する際に, 一匹のレシピエントにつき約 20 個の胚を要するが, マウスやラットでは胚の超低温保存技術が確立されている(Mochida *et al.*, 2011; Seita *et al.*, 2009)ため, ゲノム編集を行うためにあらかじめ多数の前核期胚をストックしておくことや, 核酸を注入した胚を保存しておくことで, より効率的に KO 個体を作成することが可能である. 一方, ブタでは材料となる前核期胚の入手に食肉処理場由来の卵巢から未成熟卵を回収し IVM・IVF を経るといった煩雑な方法を行う必要があることに加えて, 胚移植の際に一頭のレシピエントにつき約 100 個と多量の胚を要する(Somfai *et al.*, 2012)ため, マウスやラットよりも胚の保存技術の重要性は高い. しかし, ブタでは前核期胚の超低温保存技術の成功例はほとんどなく, 当然超低温保存したブタ前核期胚を用いて KO 個体を作成したという報告はない. 本研究では, 超低温保存技術のひとつである最小容量ガラス化保存法 (Kuwayama, 2007)を改良し, 平衡液への平衡時間を 10 分間行い, 保存液に新規凍害保護物質である COOH-PLL を 20% (w/v)添加することで保存後の胚盤胞への発生能(図 8)および細胞数(表 2)を向上させることに成功した. また, 本保存法により

保存したブタ前核期胚は産子へ発育することも確認しており(表 3), 今後ゲノム編集技術により KO ブタを作出する際に材料の効率的な供給源として貢献できる保存法を確立したと考えられる. 我々のグループは, すでにマウス前核期胚(Shibao *et al.*, 2014)および未受精卵(Watanabe *et al.* 2013)において COOH-PLL 添加保存液を用いてガラス化保存した胚/卵の産子への発育能を改善しており, 今後は超低温保存がより難しい種や細胞への応用や臨床への応用が期待できる.

CRISPR/Cas9 によりゲノム編集を行う際には, 前核期胚に gRNA と Cas9 を注入するだけで胚に変異を導入可能である. マウスやラットなどの世代サイクルが短い動物では, いくつか gRNA を作製し, Cas9 とともに受精卵に注入後, 産まれた個体を選別する方法が可能であるが, ブタでは世代サイクルが長いいため予め gRNA の選別を入念に行う必要がある. そのため, ゲノム編集した体細胞をスクリーニングし, 核移植を経て KO 個体を作成した報告例が多い(Li *et al.*, 2015; Butler *et al.*, 2016; Bi *et al.*, 2016; Niu *et al.*, 2017). しかし, 核移植は技術的なむずかしさに加えて, 胚の発生率は低いため, 前核期胚に gRNA と Cas9 を注入する方法で効率的にブタ KO 個体を作成することが可能となることが望ましいと考えられる. 本研究で gRNA の選別に用いた pCAG-EGxxFP による活性評価(Mashiko *et al.*, 2013)では, gRNA の活性を簡便に評価することが可能であり, ブタをはじめとする世代サイクルが長い家畜の CRISPR/Cas9 を行う際には非常に効率的であると考えられた. 本研究で用いた gRNA では, 最も高い発生率を示した 25 ng/ μ L gRNA および Cas9 mRNA を注入した前核期胚由来の胚盤胞において 50%の遺伝子変異導入率を示しており, pCAG-EGxxFP によって活性の高い gRNA を選別できたと考えられる. また, 本研究では 5 ng/ μ L, 12.5 ng/ μ L, 25 ng/ μ L および 50 ng/ μ L の gRNA および Cas9 mRNA を前核期胚に注入したが, 注入濃度により胚盤胞への発生率には影響を及ぼさなかった. gRNA および Cas9 タンパク質注

入前核期胚では、10 ng/ μ L, 25 ng/ μ L および 50 ng/ μ L の濃度では胚盤胞率に影響を及ぼさなかった。しかし、12.5 ng/ μ L 以上の Cas9 mRNA では 2・4 細胞期胚への発生率が低下していたことから、母性因子依存性の発生から胚自身のゲノム依存性に切り替わる「胚ゲノムの活性化」(Matoba *et al.*, 2014)がブタ胚で起こる 4 細胞期胚以前の胚は不安定であり、注入した外来 mRNA の影響を受けやすいのではないかと考えられる。また、本研究において、胚盤胞のゲノムシーケンスにより両アレルに変異が生じた胚盤胞は 1 つしか確認されなかったが、着床前の初期胚の発生には LIF が関与していると報告されており(Cheng *et al.*, 2016), 本研究においては胚発生過程で LIF が KO されたために胚盤胞へ発生せず、結果として両アレル変異胚が 1 つしかみられなかった可能性は否定できない。しかし、マウスでは LIF KO マウスは胚性致死ではないことが明らかであるため、初期胚の発生過程における LIF の役割や動物種による違いについても、さらなる研究が必要である。また、本研究において、ガラス化保存ブタ前核期胚に CRISPR/Cas9 システムを導入し、胚盤胞への発生能を有することをはじめて明らかにした。さらに、その胚盤胞はゲノム変異を起こしており、未だ改善の余地はあるものの、この知見は今後ゲノム編集ブタ作製の効率化に寄与するものと考えられる。しかし、前核期胚の移植後に胎子を得ることはできなかったため、胚盤胞以降の発生に LIF が関与している可能性を調べるため、LIF および LIF 受容体の発現と局在を調べた。その結果、ブタ胚盤胞において LIF および LIF 受容体が発現していることが明らかになり、胚盤胞以降の発生に LIF が関与している可能性が示唆された。しかし、本研究では CRISPR/Cas9 システム導入胚が胎子へ発生しなかった理由として移植の技術的な要因やレシピエントの個体要因あるいは妊娠中の環境要因なども否定できないため、ブタにおける胚発生中の LIF の機能についてはさらなる研究が求められる。

結論

本研究により, COOH-PLL によってガラス化保存したブタ前核期胚の体外発生能の改良に成功(Kamoshita *et al.*, PLoS One, 2017)した. また, ブタ前核期胚への CRISPR/Cas9 システムの導入条件が胚の生存性とゲノム変異率に影響を及ぼすことを示した. さらに, LIF をターゲットとした CRISPR/Cas9 システムを導入したガラス化保存ブタ前核期胚が胚盤胞への発生能を有することを示し, その胚盤胞の標的遺伝子にゲノム変異が認められた.

本論文の一部は以下に公表した.

Kamoshita M, Kato T, Fujiwara K, Namiki T, Matsumura K, Hyon SH, Ito J, Kashiwazaki N. Successful vitrification of pronuclear-stage pig embryos with a novel cryoprotective agent, carboxylated epsilon-poly-L-lysine. PLoS One 2017; 12:e0176711.

参考文献

Arav A. Cryopreservation of oocytes and embryos. *Theriogenology* 2014 Jan 1;81(1):96-102.

Bagis H, Mercan HO, Cetin S, Sekmen S. The effect of equilibration time on survival and development rates of mouse pronuclear-stage embryos vitrified in solid surface (SSV) and conventional straws: in vitro and in vivo evaluations. *Mol Reprod Dev* 2005 Dec;72(4):494-501.

Bhat SA, Malik AA, Ahmad SM, Shah RA, Ganai NA, Shafi SS, *et al.* Advances in genome editing for improved animal breeding: A review. *Vet World* 2017 Nov;10(11):1361-1366.

Bi Y, Hua Z, Liu X, Hua W, Ren H, Xiao H, *et al.* Isozygous and selectable marker-free MSTN knockout cloned pigs generated by the combined use of CRISPR/Cas9 and Cre/LoxP. *Sci Rep* 2016 Aug 17;6:31729.

Bibikova M, Beumer K, Trautman JK, Carroll D. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science* 2003 May 2;300(5620):764.

Bibikova M, Golic M, Golic KG, Carroll D. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics* 2002 Jul;161(3):1169-1175.

Blitek A, Morawska E, Ziecik AJ. Regulation of expression and role of leukemia inhibitory factor and interleukin-6 in the uterus of early pregnant pigs. *Theriogenology* 2012 Sep 15;78(5):951-964.

Boch J, Bonas U. Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annu Rev Phytopathol* 2010;48:419-436.

Brinster RL, Chen HY, Trumbauer ME, Yagle MK, Palmiter RD. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985 Jul;82(13):4438-4442.

Cha J, Sun X, Dey SK. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nat Med* 2012 Dec;18(12):1754-1767.

Cheng EH, Liu JY, Lee TH, Huang CC, Chen CI, Huang LS, *et al.* Requirement of Leukemia Inhibitory Factor or Epidermal Growth Factor for Pre-Implantation Embryogenesis via JAK/STAT3 Signaling Pathways. *PLoS One* 2016 Apr 20;11(4):e0153086.

Cheng TC, Huang CC, Chen CI, Liu CH, Hsieh YS, Huang CY, *et al.* Leukemia inhibitory factor antisense oligonucleotide inhibits the development of murine embryos at preimplantation stages. *Biol Reprod* 2004 May;70(5):1270-1276.

Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 2013 Feb 15;339(6121):819-823.

Dobrinski I. Germ cell transplantation and testis tissue xenografting in domestic animals. *Anim Reprod Sci* 2005 Oct;89(1-4):137-145.

Flisikowska T, Thorey IS, Offner S, Ros F, Lifke V, Zeitler B, *et al.* Efficient immunoglobulin gene disruption and targeted replacement in rabbit using zinc finger nucleases. PLoS One 2011;6(6):e21045.

Fujiwara K, Sano D, Seita Y, Inomata T, Ito J, Kashiwazaki N. Ethylene glycol-supplemented calcium-free media improve zona penetration of vitrified rat oocytes by sperm cells. J Reprod Dev 2010 Feb;56(1):169-175.

Han YM, Wang WH, Abeydeera LR, Petersen AL, Kim JH, Murphy C, *et al.* Pronuclear location before the first cell division determines ploidy of polyspermic pig embryos. Biol Reprod 1999 Nov;61(5):1340-1346.

Hauschild J, Petersen B, Santiago Y, Queisser AL, Carnwath JW, Lucas-Hahn A, *et al.* Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases. Proc Natl Acad Sci U S A 2011 Jul 19;108(29):12013-12017.

Hayashi S, Kobayashi K, Mizuno J, Saitoh K, Hirano S. Birth of piglets from frozen embryos. Vet Rec 1989 Jul 8;125(2):43-44.

Hisamatsu S, Sakaue M, Takizawa A, Kato T, Kamoshita M, Ito J, *et al.* Knockout of targeted gene in porcine somatic cells using zinc-finger nuclease. Anim Sci J 2015 Feb;86(2):132-137.

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 2012 Aug 17;337(6096):816-821.

Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife* 2013 Jan 29;2:e00471.

Kamoshita M, Kato T, Fujiwara K, Namiki T, Matsumura K, Hyon SH, *et al.* Successful vitrification of pronuclear-stage pig embryos with a novel cryoprotective agent, carboxylated epsilon-poly-L-lysine. *PLoS One* 2017 Apr 27;12(4):e0176711.

Kaneko T, Sakuma T, Yamamoto T, Mashimo T. Simple knockout by electroporation of engineered endonucleases into intact rat embryos. *Sci Rep* 2014 Oct 1;4:6382.

Kashiwazaki N, Ohtani S, Miyamoto K, Ogawa S. Production of normal piglets from hatched blastocysts frozen at -196 degrees C. *Vet Rec* 1991 Mar 16;128(11):256-257.

Kikuchi K, Nagai T, Kashiwazaki N, Ikeda H, Noguchi J, Shimada A, *et al.* Cryopreservation and ensuing in vitro fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4 degrees C. *Theriogenology* 1998 Sep;50(4):615-623.

Kikuchi K, Onishi A, Kashiwazaki N, Iwamoto M, Noguchi J, Kaneko H, *et al.* Successful piglet production after transfer of blastocysts produced by a modified in vitro system. *Biol Reprod* 2002 Apr;66(4):1033-1041.

Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 Feb 6;93(3):1156-1160.

Kohaya N, Fujiwara K, Ito J, Kashiwazaki N. Generation of live offspring from vitrified mouse oocytes of C57BL/6J strain. *PLoS One* 2013;8(3):e58063.

Kono T, Suzuki T, Tsunoda Y. Cryopreservation of rat blastocysts by vitrification. *Cryobiology* 1988;25:170-173.

Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology* 2007 Jan 1;67(1):73-80.

Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil Steril* 1999 Dec;72(6):1073-1078.

Langendijk P, Chen TY, Athorn RZ, Bouwman EG. Embryonic survival at day 9, 21 and 35 of pregnancy in intact and unilaterally oviduct ligated multiparous sows. *Animal* 2016 Aug;10(8):1336-1341.

Li J, Zhang Y, Chen KL, Shan QW, Wang YP, Liang Z, *et al.* CRISPR/Cas: a novel way of RNA-guided genome editing. *Yi Chuan* 2013 Nov;35(11):1265-1273.

Li P, Estrada JL, Burlak C, Montgomery J, Butler JR, Santos RM, *et al.* Efficient generation of genetically distinct pigs in a single pregnancy using multiplexed single-guide RNA and carbohydrate selection. *Xenotransplantation* 2015 Jan-Feb;22(1):20-31.

Li W, Teng F, Li T, Zhou Q. Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol* 2013 Aug;31(8):684-686.

Lillico SG, Proudfoot C, Carlson DF, Stverakova D, Neil C, Blain C, *et al.* Live pigs produced from genome edited zygotes. *Sci Rep* 2013 Oct 10;3:2847.

Martinez AG, Matkovic M. Cryopreservation of ovine embryos: slow freezing and vitrification. *Theriogenology* 1998; 49:1039-1049.

Martino A, Songsasen N, Leibo SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod* 1996 May;54(5):1059-1069.

Mashiko D, Fujihara Y, Satouh Y, Miyata H, Isotani A, Ikawa M. Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Sci Rep* 2013 Nov 27;3:3355.

Mashiko D, Young SA, Muto M, Kato H, Nozawa K, Ogawa M, *et al.* Feasibility for a large scale mouse mutagenesis by injecting CRISPR/Cas plasmid into zygotes. *Dev Growth Differ* 2014 Jan;56(1):122-129.

Mashimo T, Kaneko T, Sakuma T, Kobayashi J, Kunihiro Y, Voigt B, *et al.* Efficient gene targeting by TAL effector nucleases coinjected with exonucleases in zygotes. *Sci Rep* 2013;3:1253.

Matoba S, Liu Y, Lu F, Iwabuchi KA, Shen L, Inoue A, *et al.* Embryonic development following somatic cell nuclear transfer impeded by persisting histone methylation. *Cell* 2014 Nov 6;159(4):884-895.

Matsumura K, Hyon SH. Polyampholytes as low toxic efficient cryoprotective agents with antifreeze protein properties. *Biomaterials* 2009 Sep;30(27):4842-4849.

McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KH, Colman A, Schnieke AE, Kind AJ. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature* 2000 Jun 29;405(6790):1066-1069.

Meng S, Ryu S, Zhao B, Zhang DQ, Driever W, McMahon DG. Targeting retinal dopaminergic neurons in tyrosine hydroxylase-driven green fluorescent protein transgenic zebrafish. *Mol Vis* 2008;14:2475-2483.

Mo X, Wu G, Yuan D, Jia B, Liu C, Zhu S, *et al.* Leukemia inhibitory factor enhances bovine oocyte maturation and early embryo development. *Mol Reprod Dev* 2014 Jul;81(7):608-618.

Mochida K, Hasegawa A, Taguma K, Yoshiki A, Ogura A. Cryopreservation of mouse embryos by ethylene glycol-based vitrification. *J Vis Exp* 2011 Nov 18;(57). pii: 3155. doi(57):10.3791/3155.

Nagai T, Funahashi H, Yoshioka K, Kikuchi K. Up date of in vitro production of porcine embryos. *Front Biosci* 2006 Sep 1;11:2565-2573.

Nagashima H, Hiruma K, Saito H, Tomii R, Ueno S, Nakayama N, *et al.* Production of live piglets following cryopreservation of embryos derived from in vitro-matured oocytes. *Biol Reprod* 2007 May;76(5):900-905.

Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG, Nottle MB. Cryopreservation of porcine embryos. *Nature* 1995 Mar 30;374(6521):416.

Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG, Seamark RF, Nottle MB. Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. *Biol Reprod* 1994 Oct;51(4):618-622.

Nagashima H, Matsunari H. Growing human organs in pigs-A dream or reality? *Theriogenology* 2016 Jul 1;86(1):422-426.

Nagy ZP, Anderson RE, Feinberg EC, Hayward B, Mahony MC. The Human Oocyte Preservation Experience (HOPE) Registry: evaluation of cryopreservation techniques and oocyte source on outcomes. *Reprod Biol Endocrinol* 2017 Feb 7;15(1):10-017-0228-7.

Nakagawa Y, Sakuma T, Sakamoto T, Ohmuraya M, Nakagata N, Yamamoto T. Production of knockout mice by DNA microinjection of various CRISPR/Cas9 vectors into freeze-thawed fertilized oocytes. *BMC Biotechnol* 2015 May 22;15:33-015-0144-x.

Nakamura H, Kimura T, Koyama S, Ogita K, Tsutsui T, Shimoya K, *et al.* Mouse model of human infertility: transient and local inhibition of endometrial STAT-3 activation results in implantation failure. *FEBS Lett* 2006 May 15;580(11):2717-2722.

Niu D, Wei HJ, Lin L, George H, Wang T, Lee IH, *et al.* Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. *Science* 2017 Sep 22;357(6357):1303-1307.

Polge C, Rowson LE, Chang MC. The effect of reducing the number of embryos during early stages of gestation on the maintenance of pregnancy in the pig. *J Reprod Fertil* 1966 Oct;12(2):395-397.

Quinn P, Kerin JF. Experience with the cryopreservation of human embryos using the mouse as a model to establish successful techniques. *J in Vitro Fert Embryo Transf* 1986;3:40-45.

Rall WF. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 1987 Oct;24(5):387-402.

Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature* 1985 Feb 14-20;313(6003):573-575.

Richt JA, Kasinathan P, Hamir AN, Castilla J, Sathiyaseelan T, Vargas F, *et al.* Production of cattle lacking prion protein. *Nat Biotechnol* 2007 Jan;25(1):132-138.

Rienzi L, Gracia C, Maggiulli R, LaBarbera AR, Kaser DJ, Ubaldi FM, *et al.* Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. *Hum Reprod Update* 2017 Mar 1;23(2):139-155.

Romar R, Funahashi H, Coy P. In vitro fertilization in pigs: New molecules and protocols to consider in the forthcoming years. *Theriogenology* 2016 Jan 1;85(1):125-134.

Ryu J, Prather RS, Lee K. Use of gene-editing technology to introduce targeted modifications in pigs. *J Anim Sci Biotechnol* 2018 Jan 29;9:5-017-0228-7. eCollection 2018.

Saha S, Takagi M, Boediono A, Suzuki T. Direct rehydration of in vitro fertilised bovine embryos after vitrification. *Vet Rec* 1994 Mar 12;134(11):276-277.

Schiewe MC, Rall WF, Stuart LD, Wildt DE. Analysis of cryoprotectant, cooling rate and in situ dilution using conventional freezing or vitrification for cryopreserving sheep embryos. *Theriogenology* 1991 Aug;36(2):279-293.

Schwartzberg PL, Goff SP, Robertson EJ. Germ-line transmission of a c-abl mutation produced by targeted gene disruption in ES cells. *Science* 1989 Nov 10;246(4931):799-803.

Seita Y, Okuda Y, Kato M, Kawakami Y, Inomata T, Ito J, *et al.* Successful cryopreservation of rat pronuclear-stage embryos by rapid cooling. *Cryobiology* 2009 Oct;59(2):226-228.

Sendai Y, Sawada T, Urakawa M, Shinkai Y, Kubota K, Hoshi H, *et al.* alpha1,3-Galactosyltransferase-gene knockout in cattle using a single targeting vector with loxP sequences and cre-expressing adenovirus. *Transplantation* 2006 Mar 15;81(5):760-766.

Shen B, Zhang J, Wu H, Wang J, Ma K, Li Z, *et al.* Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Res* 2013 May;23(5):720-723.

Shibao Y, Fujiwara K, Kawasaki Y, Matsumura K, Hyon SH, Ito J, *et al.* The effect of a novel cryoprotective agent, carboxylated epsilon-poly-L-lysine, on the developmental ability of re-vitrified mouse embryos at the pronuclear stage. *Cryobiology* 2014 Apr;68(2):200-204.

Smorag Z, Gajda B, Wieczorek B, Jura J. Stage-dependent viability of vitrified rabbit embryos. *Theriogenology* 1989 Jun;31(6):1227-1231.

Somfai T, Kikuchi K, Nagai T. Factors affecting cryopreservation of porcine oocytes. *J Reprod Dev* 2012;58(1):17-24.

Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Nakai M, Maedomari N, *et al.* Live piglets derived from in vitro-produced zygotes vitrified at the pronuclear stage. *Biol Reprod* 2009 Jan;80(1):42-49.

Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, *et al.* Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 1992 Sep 3;359(6390):76-79.

Sung YH, Baek IJ, Kim DH, Jeon J, Lee J, Lee K, *et al.* Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting. *Nat Biotechnol* 2013 Jan;31(1):23-24.

Suzuki K, Eriksson B, Shimizu H, Nagai T, Rodriguez-Martinez H. Effect of hyaluronan on monospermic penetration of porcine oocytes fertilized in vitro. *Int J Androl* 2000 Feb;23(1):13-21.

Tanihara F, Takemoto T, Kitagawa E, Rao S, Do LT, Onishi A, *et al.* Somatic cell reprogramming-free generation of genetically modified pigs. *Sci Adv* 2016 Sep 14;2(9):e1600803.

Tesson L, Usal C, Menoret S, Leung E, Niles BJ, Remy S, *et al.* Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nat Biotechnol* 2011 Aug 5;29(8):695-696.

Vajta G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim Reprod Sci* 2000 Jul 2;60-61:357-364.

Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, *et al.* Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 1998 Sep;51(1):53-58.

Valdez CA, Abas Mazni O, Takahashi Y, Hishinuma M, Kanagawa H. Effects of equilibration time, precooling and developmental stage on the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Theriogenology* 1990 Mar;33(3):627-636.

Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, *et al.* One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 2013 May 9;153(4):910-918.

Watanabe H, Kohaya N, Kamoshita M, Fujiwara K, Matsumura K, Hyon SH, *et al.* Efficient production of live offspring from mouse oocytes vitrified with a novel cryoprotective agent, carboxylated epsilon-poly-L-lysine. PLoS One 2013 Dec 23;8(12):e83613.

Watanabe M, Nakano K, Matsunari H, Matsuda T, Maehara M, Kanai T, *et al.* Generation of interleukin-2 receptor gamma gene knockout pigs from somatic cells genetically modified by zinc finger nuclease-encoding mRNA. PLoS One 2013 Oct 9;8(10):e76478.

Whittingham DG. Culture of mouse ova. J Reprod Fertil Suppl 1971;14:7-21.

Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. Science 1972;178:411-414.

Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. Nature 2012 Feb 15;482(7385):331-338.

Willadsen SM, Polge C, Rowson LE, Moor RM. Deep freezing of sheep embryos. J Reprod Fertil 1976 Jan;46(1):151-154.

Wilmut I, Rowson LE. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. Vet Rec 1973 Jun 30;92(26):686-690.

Yoshino J, Kojima T, Shimizu M, Tomizuka T. Cryopreservation of porcine blastocysts by vitrification. Cryobiology 1993 Aug;30(4):413-422.

Yu S, Luo J, Song Z, Ding F, Dai Y, Li N. Highly efficient modification of *bet* *alactoglobulin* (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle. *Cell Res* 2011 Nov;21(11):1638-1640.

Zhao D, Feng X, Zhu X, Wu T, Zhang X, Bi C. CRISPR/Cas9-assisted gRNA-free one-step genome editing with no sequence limitations and improved targeting efficiency. *Sci Rep* 2017 Nov 30;7(1):16624-017-16998-8.

謝辞

本研究を遂行するにあたり多大なるご指導,ご助言およびご鞭撻を頂きました,麻布大学 獣医学部 動物応用科学科 動物繁殖学研究室 柏崎直巳教授ならびに伊藤潤哉准教授,同獣医学部 獣医学科 解剖学第二研究室 坂上元栄准教授に心より感謝申し上げます.また,実験材料を提供して頂きました,京都工芸繊維大学 繊維科学センター 玄丞侏特任教授,北陸先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科 松村和明准教授ならびに大阪大学 微生物研究所 伊川正人教授に厚く御礼申し上げます.また,本研究は,日本学術振興会の研究補助金(特別研究員 DC2 研究奨励費)によるご支援を頂きました.深く感謝致します.さらに,多くのご支援,ご助力を頂きました水野まゆみ様をはじめ,動物繁殖学研究室の皆様にも深く感謝申し上げます.最後に私事で恐縮ですが,両親のご理解とご支援に心より感謝致します.

表1: ガラス化保存液に加えるCPAの濃度

試験区		EG %(v/v)	COOH-PLL %(w/v)
P0	平衡液	15	0
	ガラス化液	30	0
P1	平衡液	15	0.5
	ガラス化液	30	1.0
P10	平衡液	15	5.0
	ガラス化液	30	10
P20	平衡液	15	10
	ガラス化液	30	20
P30	平衡液	15	15
	ガラス化液	30	30

CPA: cryoprotectant

EG: ethylene glycol

COOH-PLL: carboxylated ϵ -poly-L-lysine

表2: COOH-PLLを含む保存液によりガラス化保存した
ブタ前核期胚から発生した胚盤胞の細胞数

試験区	供試胚数	細胞数
Fresh (ガラス化なし)	29	37.9 ± 2.8 ^a
P10	16	22.2 ± 1.1 ^b
P20	11	32.2 ± 3.7 ^{ab}

P10: 30% (v/v) EG + 10% (w/v) COOH-PLL 添加保存液

P20: 30% (v/v) EG + 20% (w/v) COOH-PLL 添加保存液

COOH-PLL: carboxylated ε-poly-L-lysine

a vs b ($P < 0.01$)

表3: P20によりガラス化保存したブタ前核期胚の産子への発生能

レシピエント 番号	移植胚数	妊娠	産子数	死産数
#1	143	×	0	0
#2	103	×	0	0
#3	111	×	0	0
#4	105	○	5	0
#5	121	×	0	0
#6	121	×	0	0
#7	117	○	1	2
#8	97	×	0	0
計	8	2	15	2

P20: 30% (v/v) EG + 20% (w/v) COOH-PLL 添加保存液

表4: gRNAおよびCas9 mRNAを注入したブタ前核期胚由来胚盤胞のゲノム変異率

試験区	供試胚数	ゲノム変異胚 (%)
R5	13	1 (7.7) ^a
R12.5	15	6 (40.0)
R25	12	6 (50.0) ^b
R50	16	2 (12.5)

R5: 5 ng/μL gRNA + Cas9 mRNA

R12.5: 12.5 ng/μL gRNA + Cas9 mRNA

R25: 25 ng/μL gRNA + Cas9 mRNA

R50: 50 ng/μL gRNA + Cas9 mRNA

(a vs b, $P < 0.05$)

表5: gRNAおよびCas9タンパク質を注入したブタ前核期胚由来胚盤胞のゲノム変異率

試験区	供試胚数	ゲノム変異胚 (%)
Pro25	6	5 (83.3)
Pro50	1	1 (100)

R25: 25 ng/μL gRNA + Cas9 タンパク質

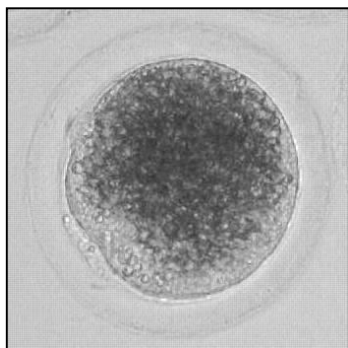
R50: 50 ng/μL gRNA + Cas9 タンパク質

表6: LIF gRNAおよびCas9タンパク質を注入した新鮮
あるいはガラス化保存ブタ前核期胚の胚移植

レシピエント	新鮮/ガラス化	移植胚数	着床
#1	新鮮	72	×
#2	新鮮	32	×
#3	ガラス化	69	×
#4	ガラス化	67	×
#5	ガラス化	67	×
計	5	307	0

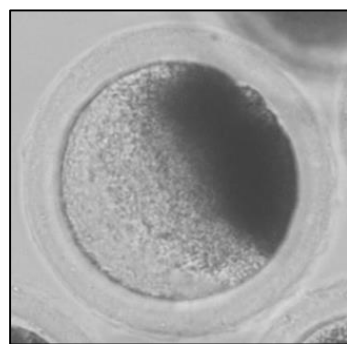
新鮮: 新鮮胚にLIF gRNAおよびCas9タンパク質を注入

ガラス化: ガラス化加温胚にLIF gRNAおよびCas9タンパク質を注入



遠心処理前

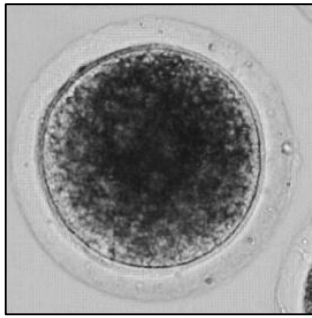
脂肪滴が全体
にみられる



遠心処理後

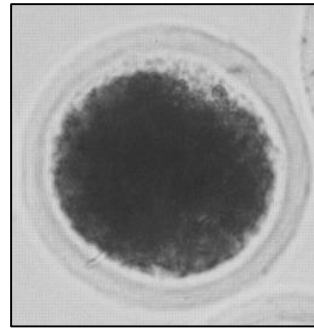
脂肪滴が偏在
している

図1:遠心処理により脂肪滴を偏在化させたブタ前核期胚



生存胚

細胞膜が明瞭
である



死亡胚

細胞膜が不明瞭
である

図2: ガラス化保存したブタ前核期胚の生存判定

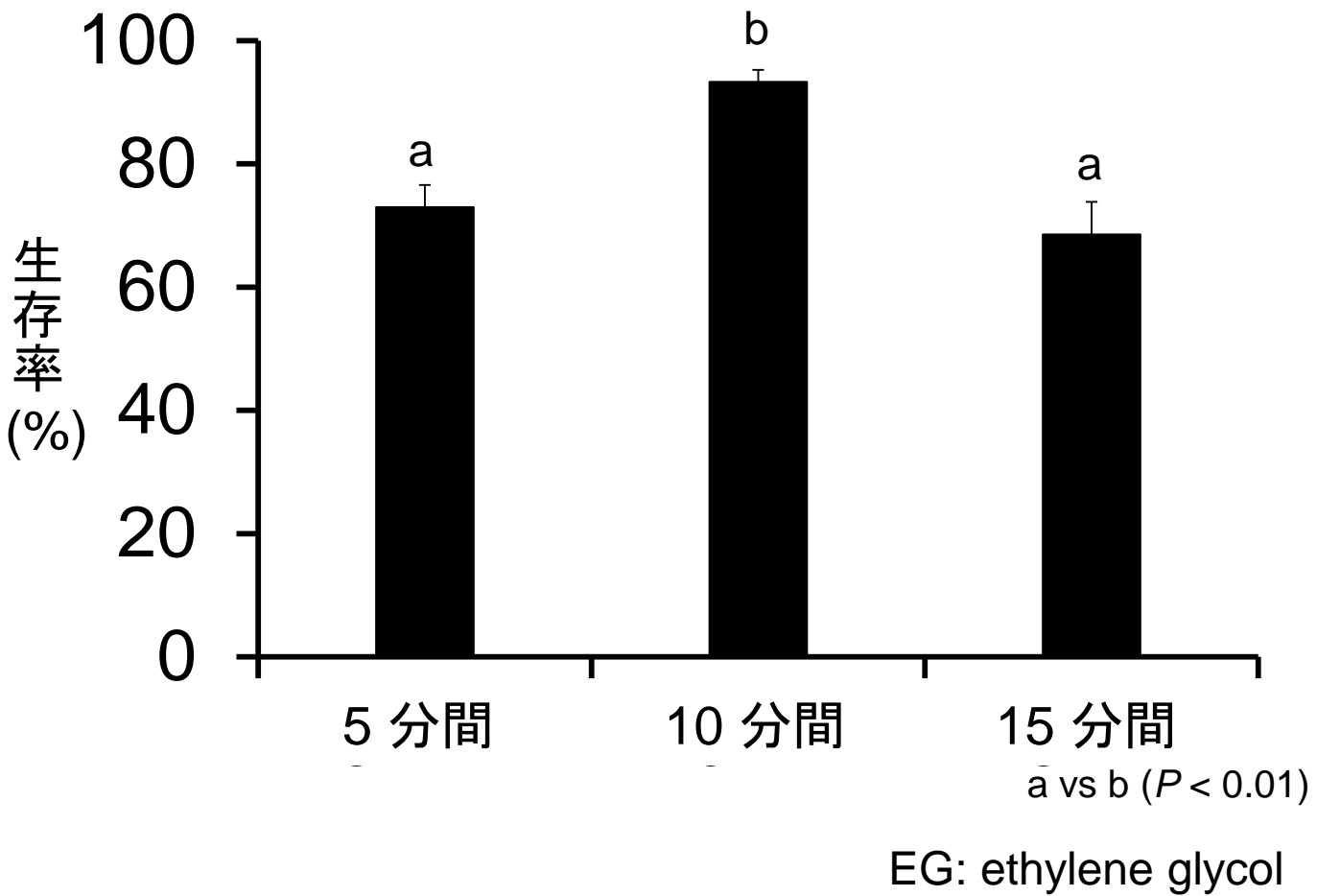


図3: P0 (30% (v/v) EG添加保存液)を用いて異なる平衡時間によりガラス化保存したブタ前核期胚の生存率

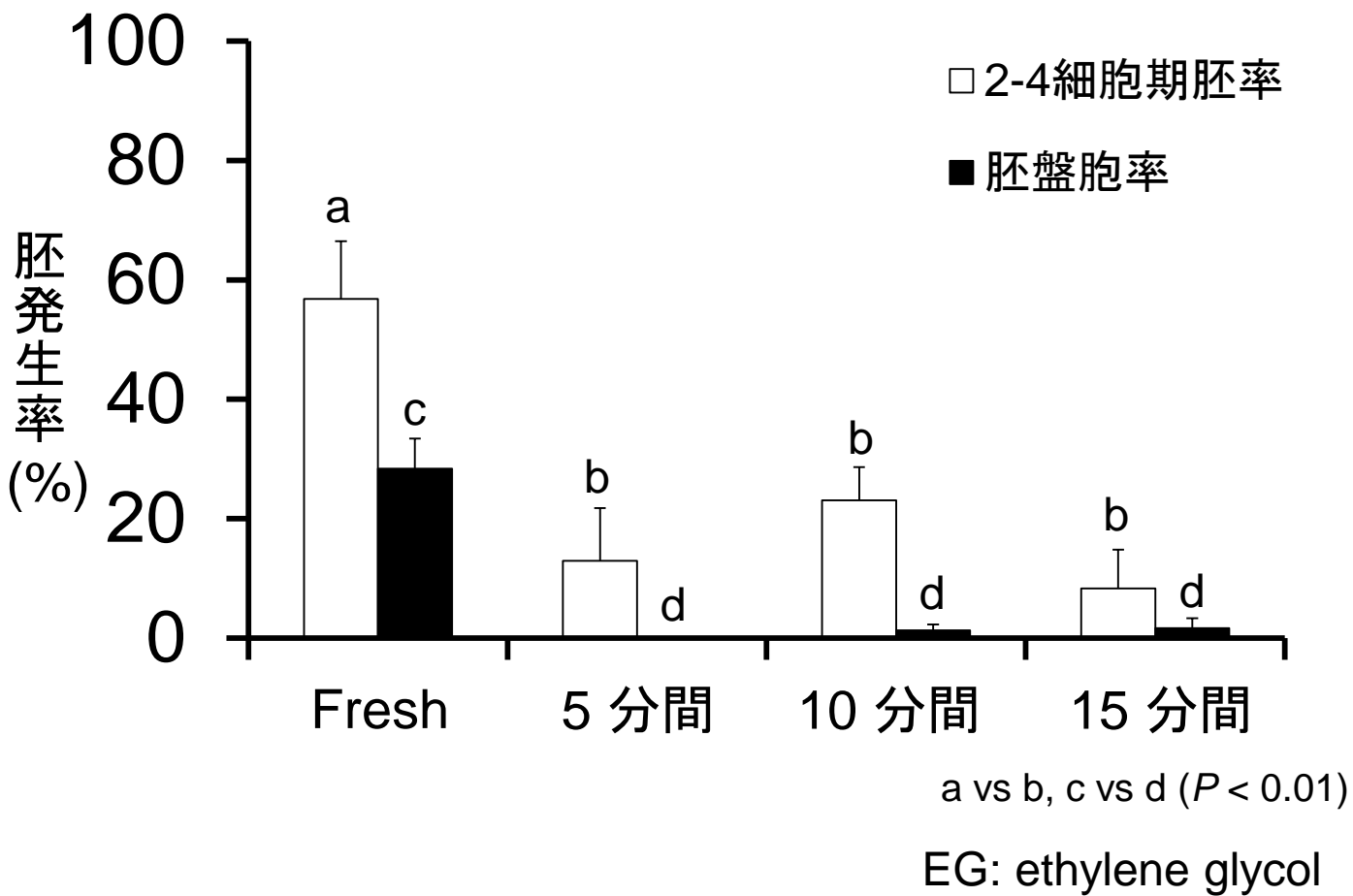


図4: P0 (30% (v/v) EG添加保存液)を用いて異なる平衡時間によりガラス化保存したブタ前核期胚の胚発生率

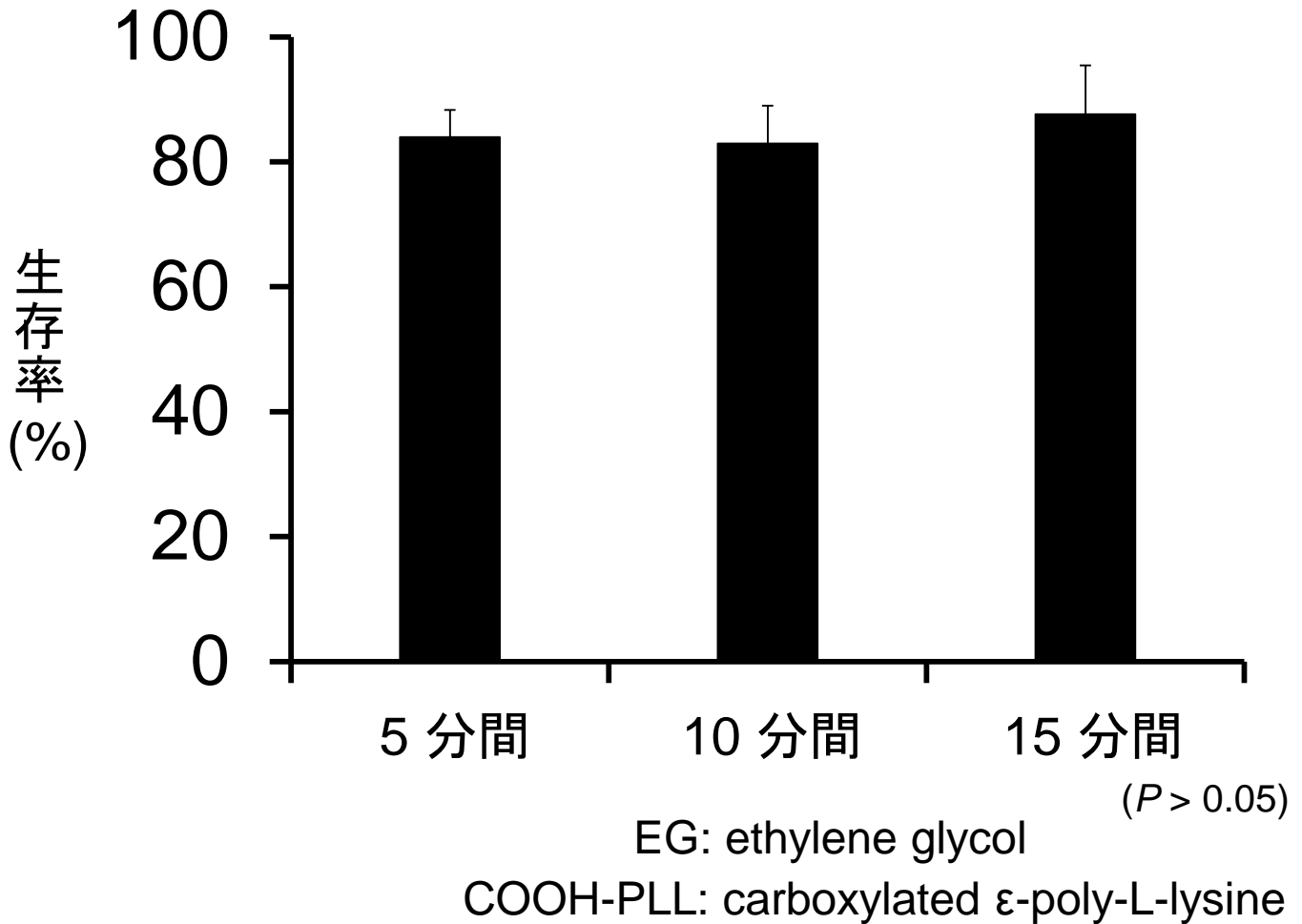
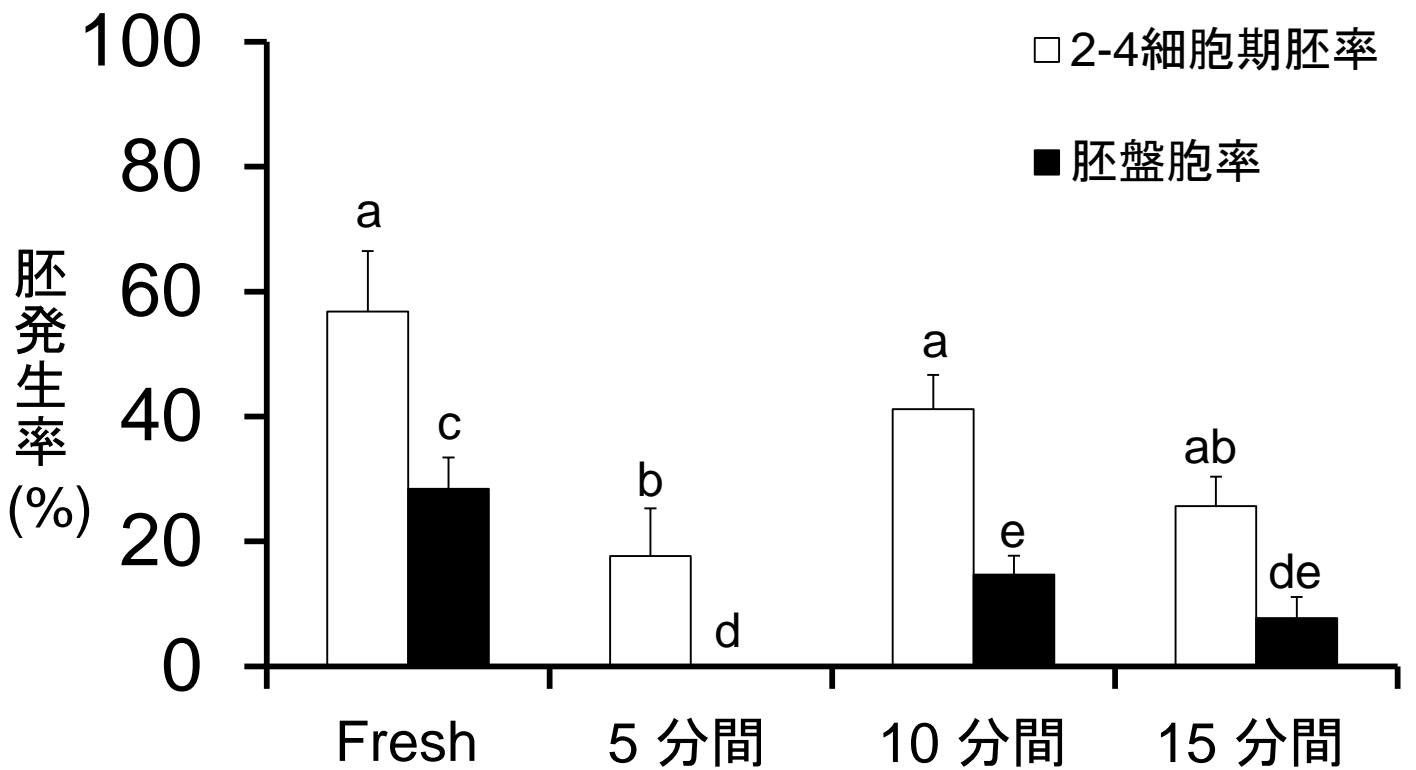


図5: P10 (30% (v/v) EG + 10% (w/v) COOH-PLL 添加保存液)を用いて異なる平衡時間によりガラス化保存したブタ前核期胚の生存率

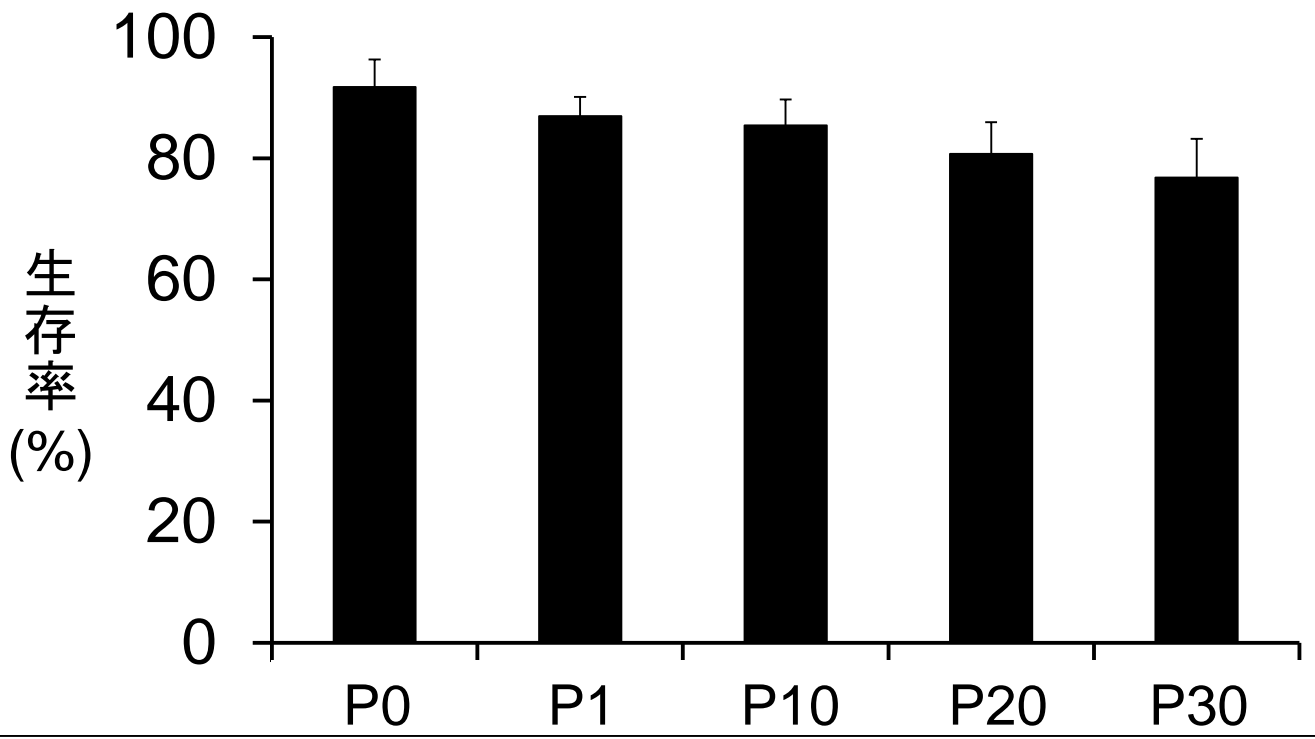


a vs b, c - e ($P < 0.05$)

EG: ethylene glycol

COOH-PLL: carboxylated ϵ -poly-L-lysine

図6: P10 (30% (v/v) EG + 10% (w/v) COOH-PLL 添加保存液)を用いて異なる平衡時間によりガラス化保存したブタ前核期胚の胚発生率



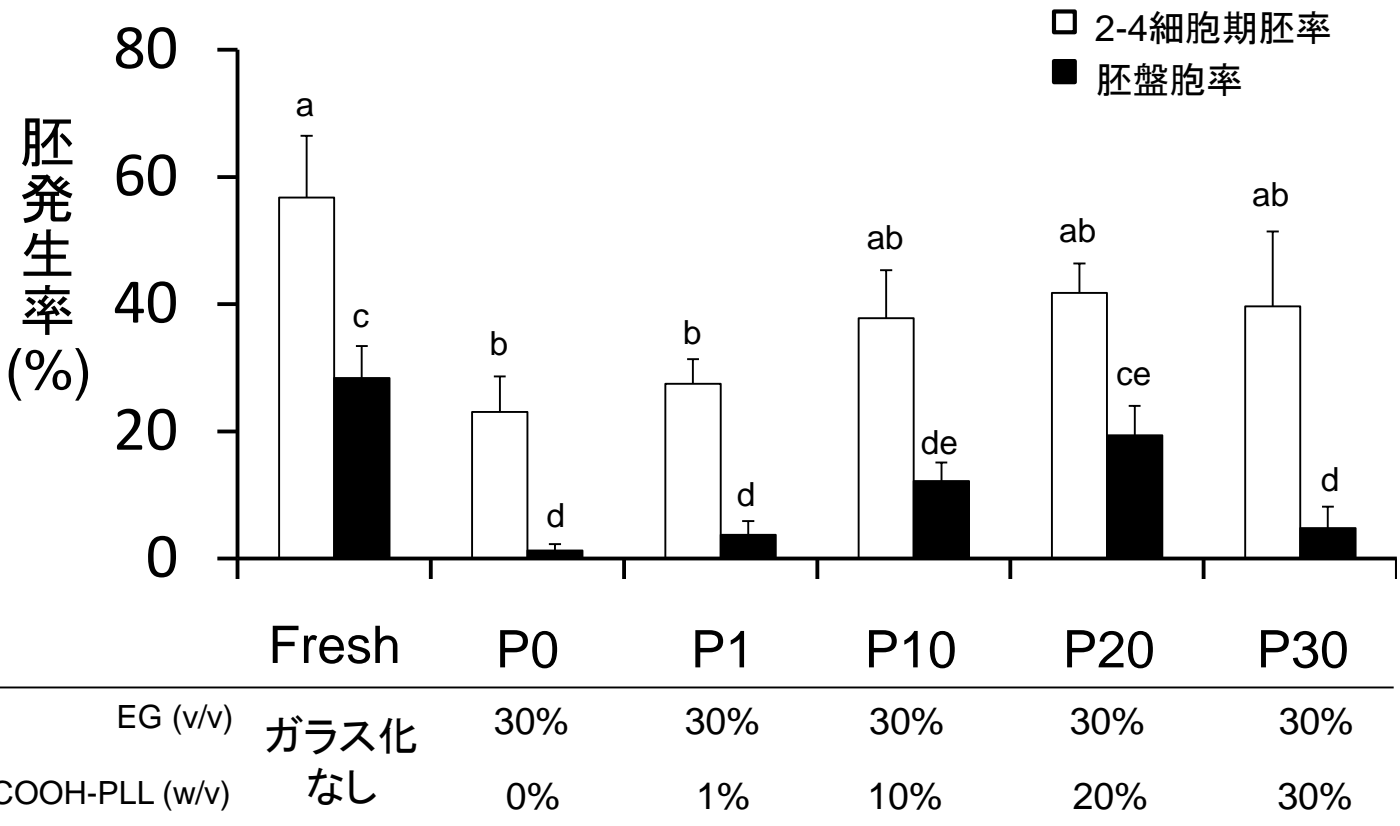
	P0	P1	P10	P20	P30
EG (v/v)	30%	30%	30%	30%	30%
COOH-PLL (w/v)	0%	1%	10%	20%	30%

EG: ethylene glycol

($P > 0.05$)

COOH-PLL: carboxylated ϵ -poly-L-lysine

図7: 異なる濃度の新規CPA COOH-PLLを含む保存液によりガラス化保存したブタ前核期胚の生存率

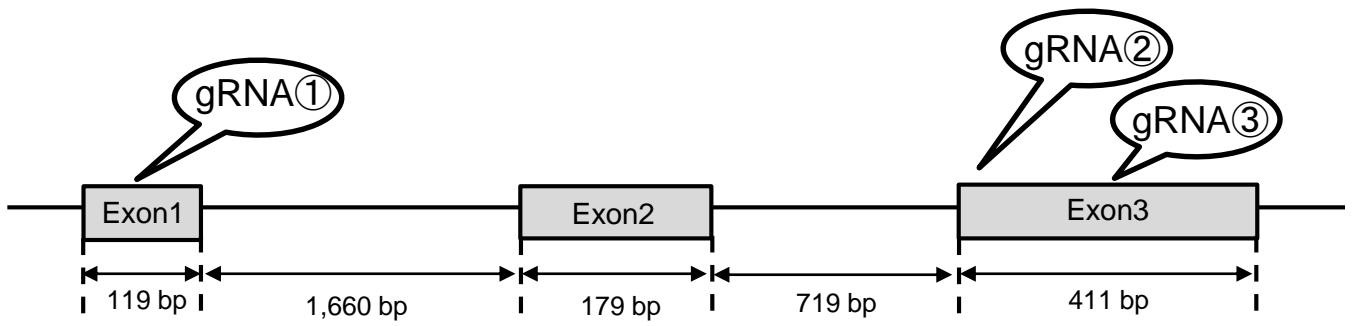


EG: ethylene glycol

COOH-PLL: carboxylated ε-poly-L-lysine

a vs b, c - e ($P < 0.05$)

図8: 異なる濃度のCPA COOH-PLLを含む保存液によりガラス化保存したブタ前核期胚の胚発生率



A:ブタLIF遺伝子

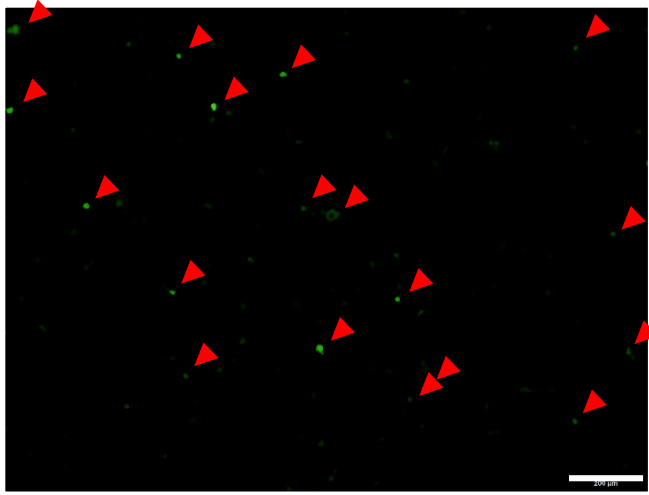
LIF gRNA① 5' - CTGAAAACTGCCGGCATCTAAGG - 3'

LIF gRNA② 5' - CCCAACGTGACCAACTTCCCGCC - 3'

LIF gRNA③ 5' - GCAACATCACGCGGGACC^{AA}AGG - 3'

B: PAM配列を有する標的部位

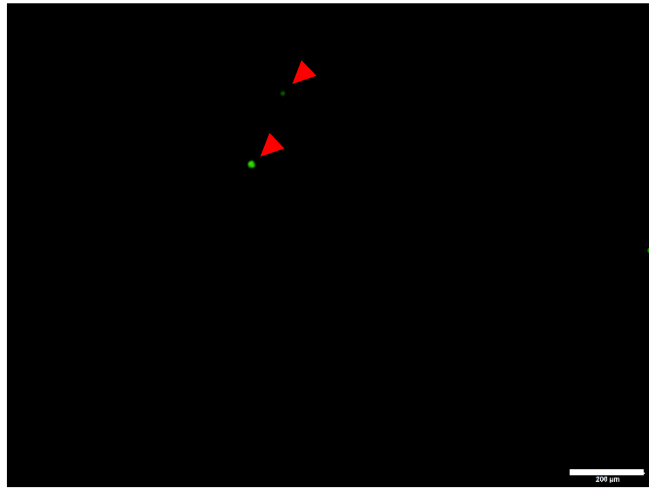
図9:ブタLIF遺伝子上の標的配列の選定とgRNAの作製



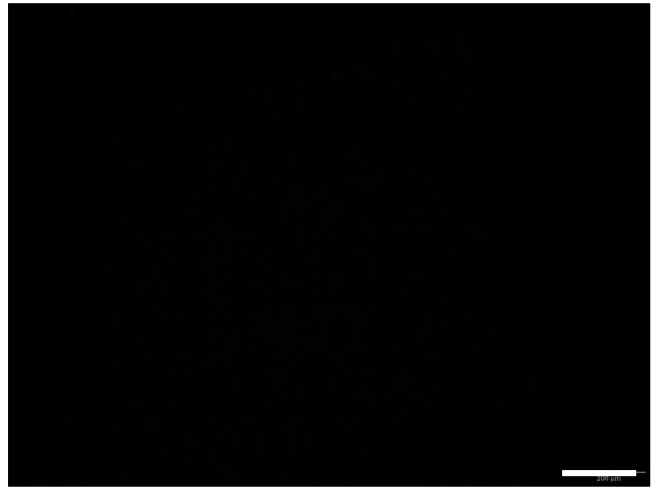
LIF gRNA①



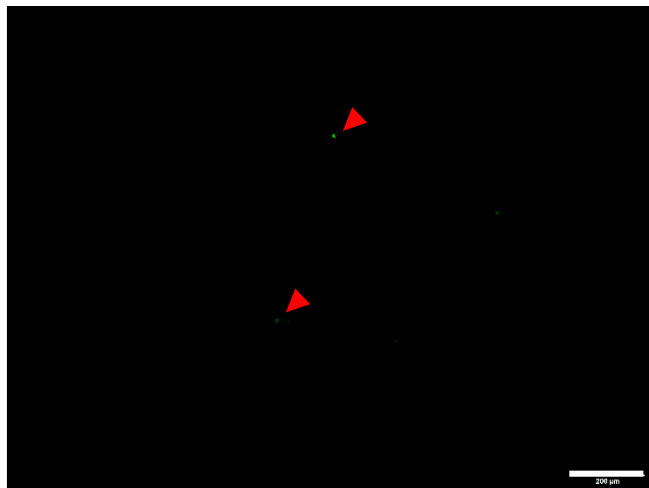
pCAG-EGxxFP



LIF gRNA②



Negative control
(プラスミドなし)



LIF gRNA③

— : 200 μ m

緑 : EGFP

pCAG-EGxxFP: CAGプロモーターの下流にenhanced GFP (EGFP)の前半の約 2/3 と 後半の約 2/3 を挿入したプラスミド

図11: pCAG-EGxxFPによるLIF gRNAの活性評価

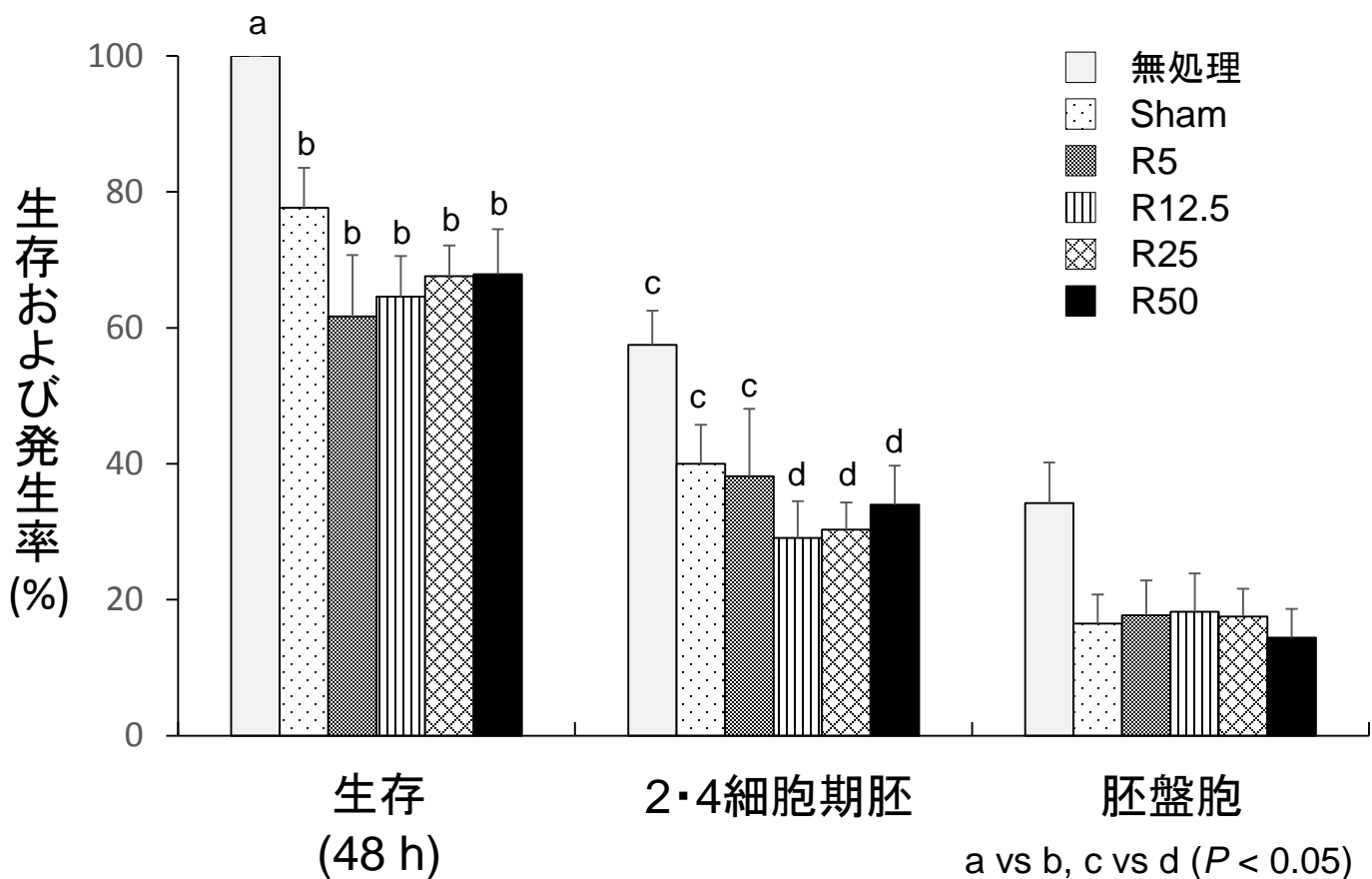


図12: LIF gRNAおよびCas9 mRNAを注入したブタ前核期胚の生存性および体外発生能

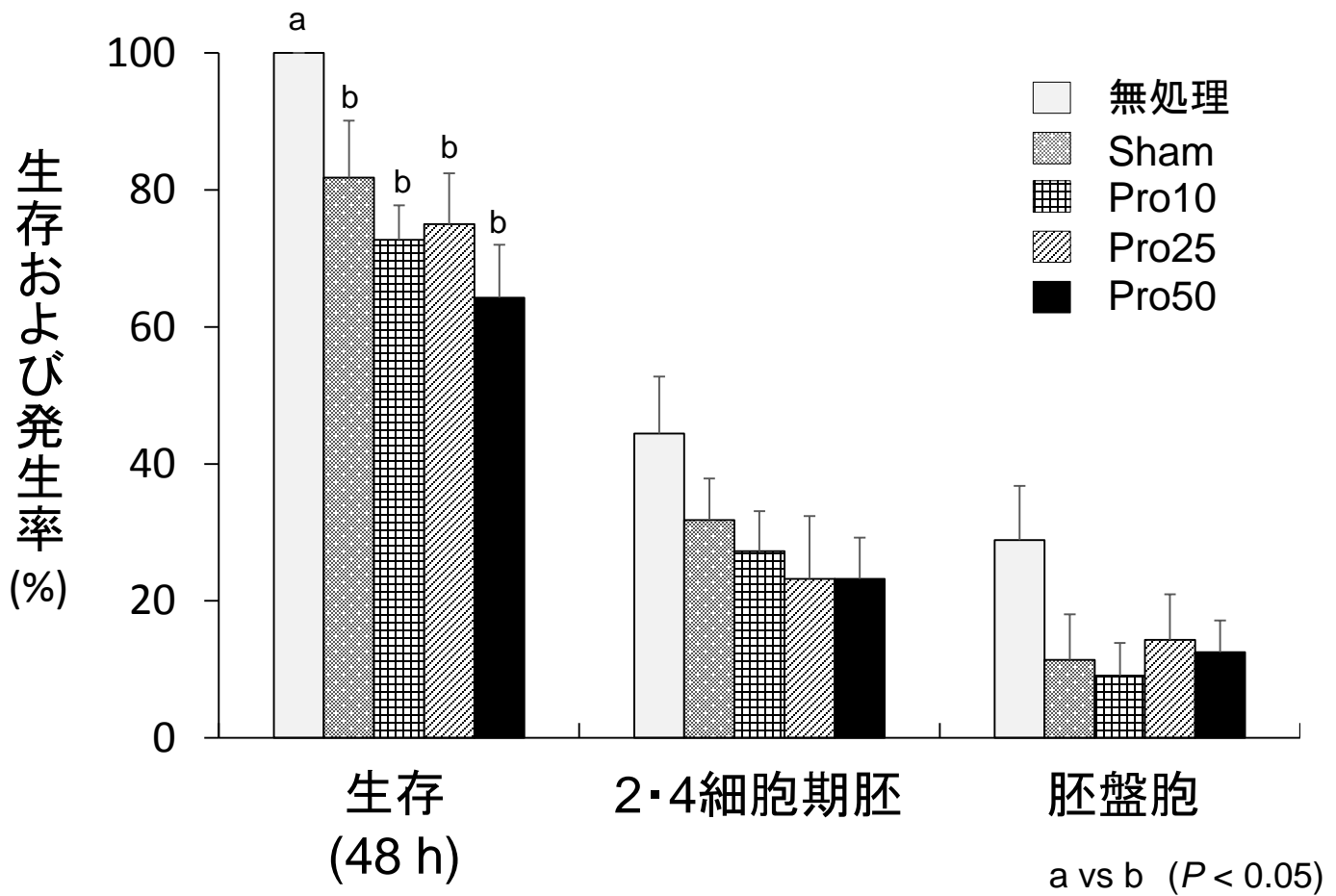


図13: LIF gRNAおよびCas9 タンパク質を注入したブタ前核期胚の生存性および体外発生能

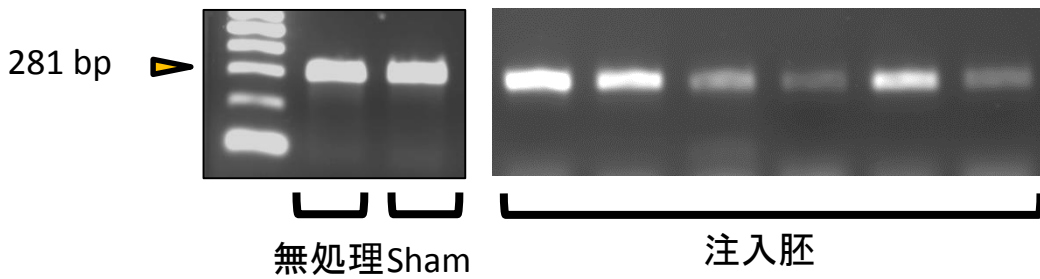


図14A: 標的配列近傍をPCRした電気泳動像

無処理 5' - ACCTCTGAAAAC**TGCCGGCATCTAAGG**TCTCCTCCAAGGCCCTCTGGAGT
 ACCTCTGAAAAC**TGCCGGCATCTAAGG**TCTCCTCCAAGGCCCTCTGGAGT
 TCAGCCATAATGAAGGTCTT -3'
 TCAGCCATAATGAAGGTCTT

R12.5 5' - ACCTCTGAAAAC**TGCCGGCATCTAAGG**TCTCCTCCAAGGCCCTCTGGAGT
 ACCTCTGAAA**TTTCCAAGGCTAAGG**TCTCCTCCAAGGCCCTCTGGAGT
 TCAGCCATAATGAAGGTCTT -3'
 TCAG**TTT**AATAATGAAGGTCTT

R25 5' - ACCTCTGAAAAC**TGCCGGCATCTAAGG**TCTCCTCCAAGGCCCTCTGGAGT
 ACCTCTGAAAAC-----
 TCAGCCATAATGAAGGTCTTGGCGGCAGGTAAATCCATCCGCCCCGCGC

 CGGCTTCCGCGCCCCGCTACGGGCCAGCGGCAACGTGGGGCACTTGGCG

 ATCGCGAGCGGACACCCACCCGCTGCAGACACACG -3' (168塩基欠損)
 -----GACACACG

赤字: 標的配列

青字: PAM配列

緑字: 挿入や置換

図14B: LIF gRNAおよびCas9 mRNAを注入した前核期胚由来胚盤胞のゲノムシーケンス結果

無処理 5' - ACCTCTGAAAAGCTGCCGGCATCTAAGGTCTCCTCCAAGGCCCTCTGGAGT
 ACCTCTGAAAAGCTGCCGGCATCTAAGGTCTCCTCCAAGGCCCTCTGGAGT
 TCAGCCCATAATGAAGGTCTT -3'
 TCAGCCCATAATGAAGGTCTT

Pro25 5' - ACCTCTGA_AACTGCCGGCATCTAAGGTCTCCTCCAAGGCCCTCTGGAGT
 ACCTCCTT_AACCCTATTCATCTAAGGTCTCCTCCAAGGCCCTCTGGAGT
 TCAGCCCATAATGAAGGTCTT -3'
 TCAGCCCATAATGAAGGTCTT

Pro50 5' - ACCTCTGAAAAGCTGCCGGCATCTAAGGTCTCCTCCAAGGCCCTCTGGAGT
 ACCCCTCCCTTTAAGTGGGGCATCTAAGGTCTCCTCCAAGGCCCTCTGGA
 TCAGCCCATAATGAAGGTCTT -3'
 GTTCAGCCCATAATGAAGGTCTT

赤字: 標的配列

青字: PAM配列

緑字: 挿入や置換

図15: LIF gRNAおよびCas9タンパク質を注入した前核期胚由来胚盤胞のゲノムシーケンス結果

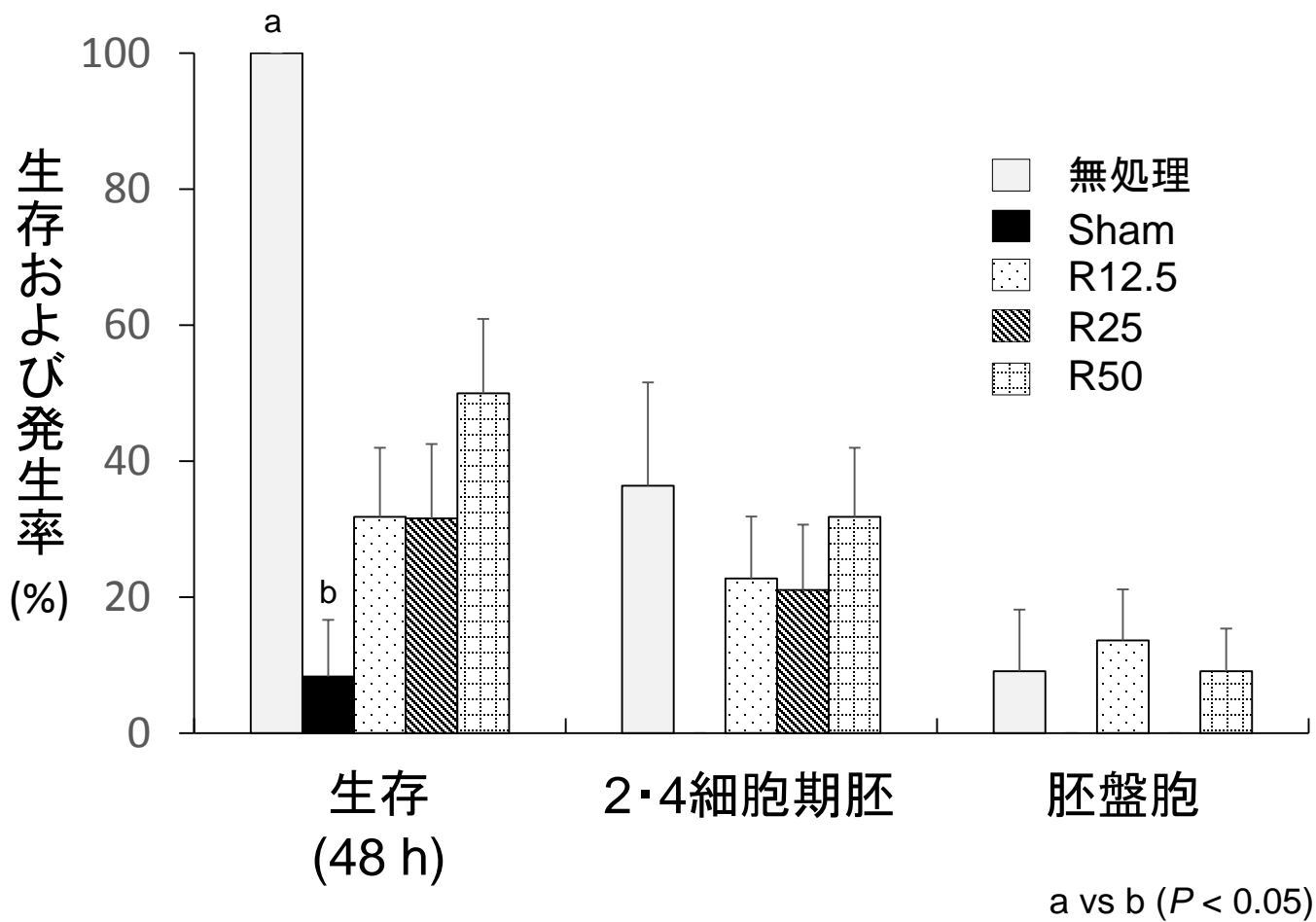


図16: LIF gRNAおよびCas9 mRNAを注入したガラス化保存ブタ前核期胚の生存性および体外発生能

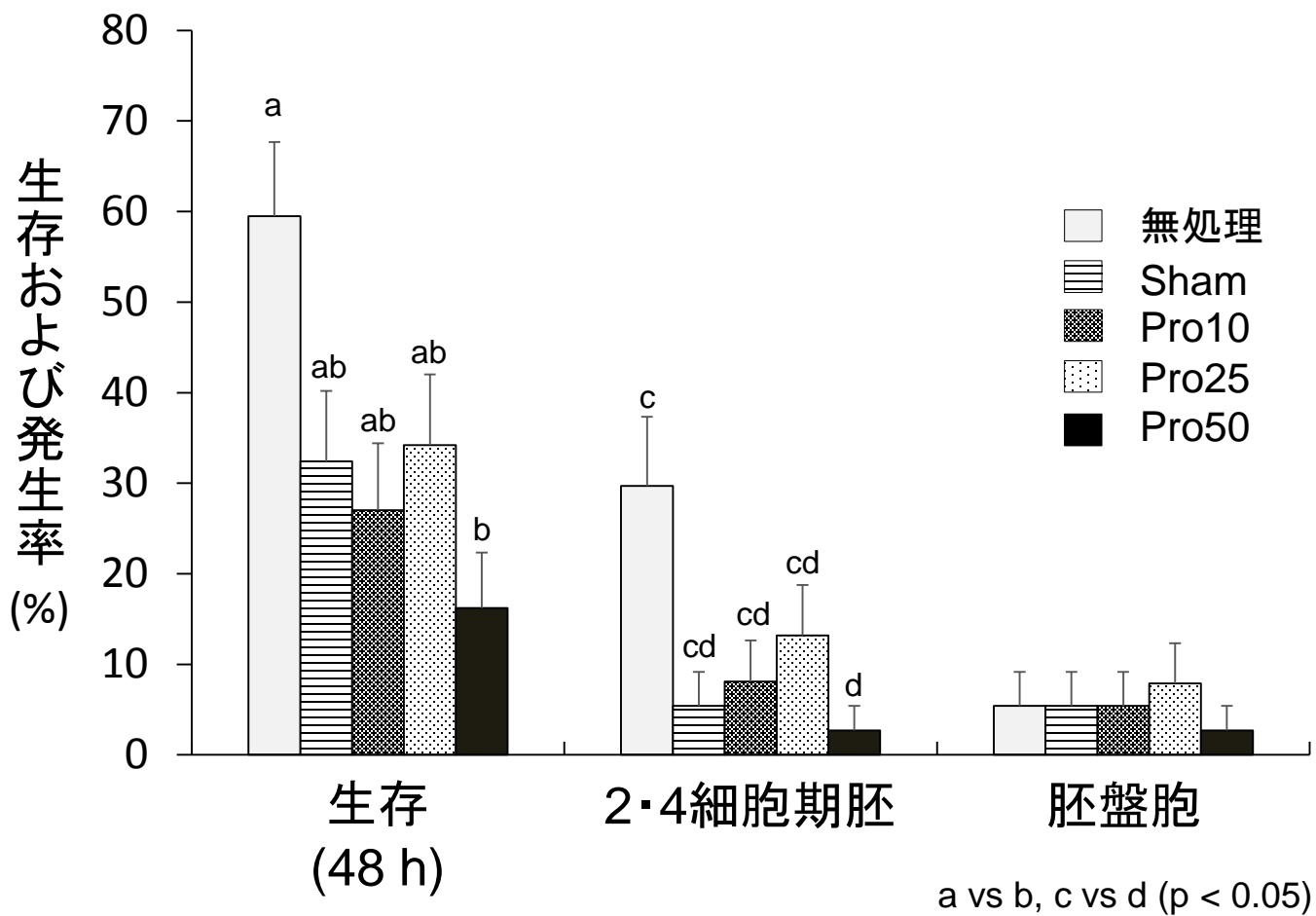


図17: LIF gRNAおよびCas9タンパク質を注入したガラス化保存ブタ前核期胚の生存性および体外発生能

無処理 5' - ACCTCTGAAAAGT GCCGGCATCTAAGGTCTCCTCCAAGGCCCTCTGGAGT
 ACCTCTGAAAAGT GCCGGCATCTAAGGTCTCCTCCAAGGCCCTCTGGAGT

TCAGCCCATAATGAAGGTCTT -3'
 TCAGCCCATAATGAAGGTCTT

ガラス化 R10 5' - ACCTCTGAAAAGT GCCGGCATCTAAGGTCTCCTCCAAGGCCCTCTGGAGT
 ACCTCCCGT TTTCTGCCGGCATCTAAGGTCTCCTCCAAGGCCCTCTGCC

TCAGCCCATAATGAAGGTCTT -3'
 TTCAGCCCATAATGAAGGTCTT

赤字: 標的配列

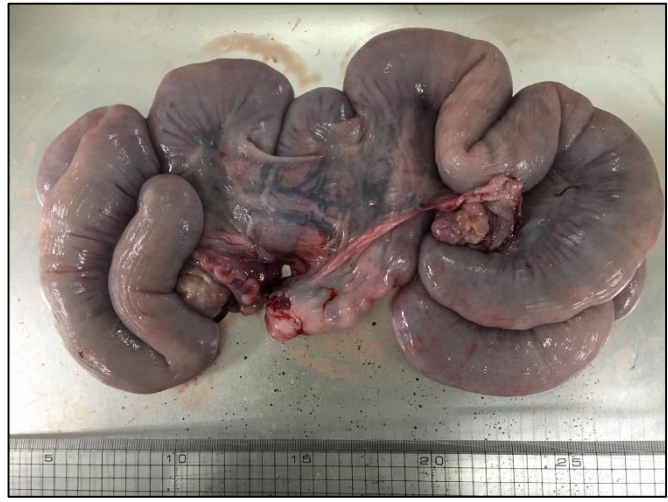
青字: PAM配列

緑字: 挿入や置換

図18: LIF gRNAおよびCas9タンパク質を注入したガラス化保存前核期胚由来胚盤胞のゲノムシーケンス結果



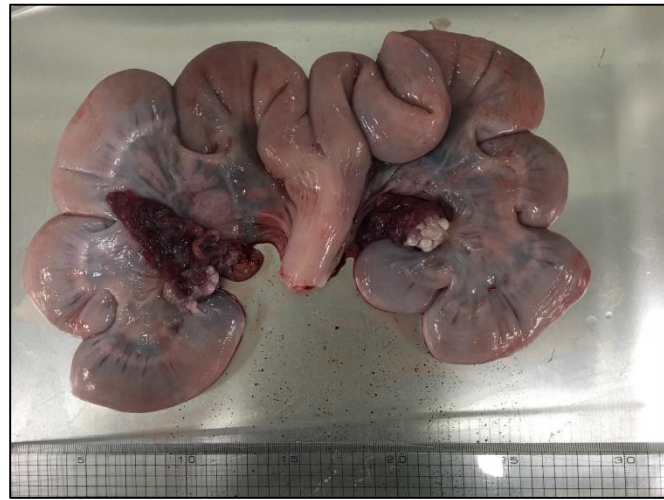
#1



#2



#3

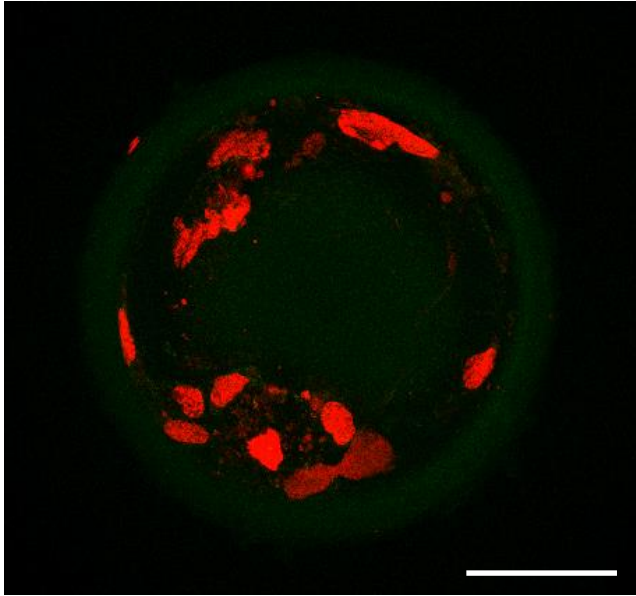


#4

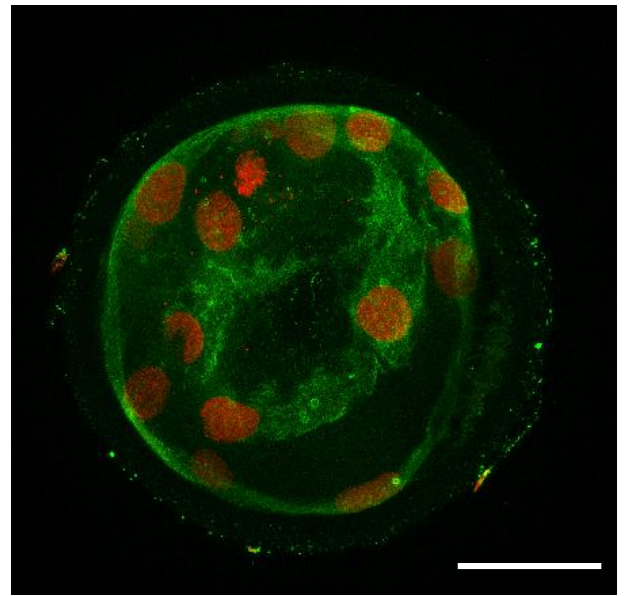


#5

図19: 胚移植後28日目に回収したレシピエントブタの子宮



Negative control



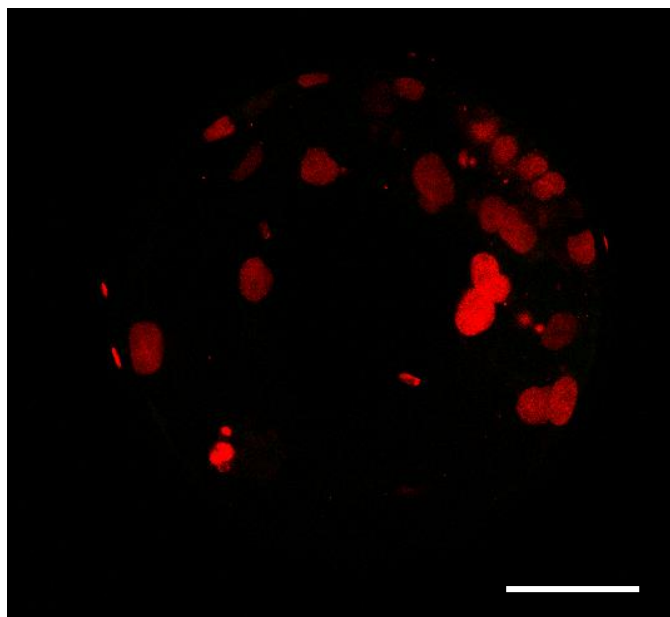
LIF + PI

緑: anti-LIF antibody rat
monoclonal IgG

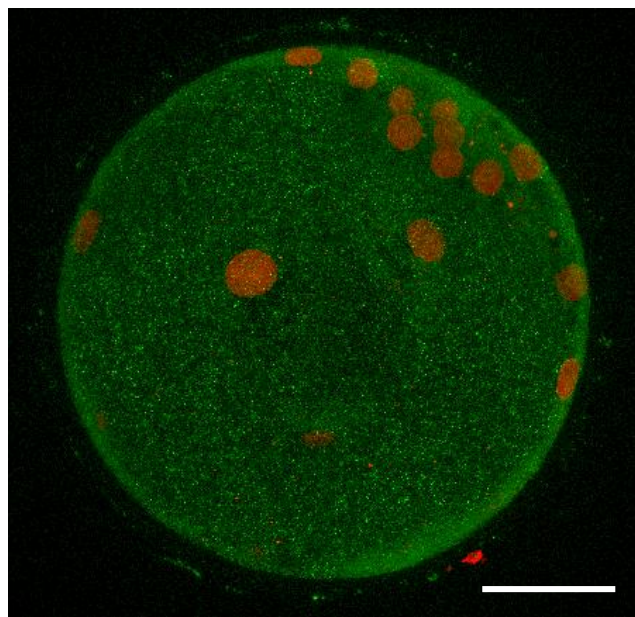
赤: PI

—: 50 μ m

図20: ブタ胚盤胞におけるLIFの発現と局在



Negative control



LIF受容体 + PI

緑 : anti-LIFR rabbit
polyclonal IgG

赤 : PI

— : 50 μ m

図21:ブタ胚盤胞におけるLIF受容体の発現と局在